

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Pat ntschrift  
10 DE 198 41 413 C 1

21 Aktenzeichen: 198 41 413.7-41  
22 Anmeldetag: 6. 8. 98  
43 Offenlegungstag: -  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 23. 9. 99

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 07 K 14/435  
C 07 K 16/00  
C 12 N 15/11  
C 12 N 15/12  
C 07 H 21/04  
C 12 N 15/79  
C 12 N 15/85  
C 12 N 5/10  
C 12 Q 1/02

DE 198 41 413 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:  
Forschungsgesellschaft GENION m.b.H, 20149  
Hamburg, DE

74 Vertreter:  
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

72 Erfinder:  
Netzer, Rainer, Dr., 22549 Hamburg, DE; Pongs,  
Olaf, Prof. Dr., 20249 Hamburg, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
EMBO 15, 1996, S. 3322-3331;

54 Neuer spannungsabhängiger Kaliumkanal und seine Verwendung zur Entwicklung von Therapeutika

57 Gegenstand der Erfindung ist ein neues spannungsabhängiges Kaliumkanalprotein, Kv6.2 (SEQ ID NO: 1). Das Kv6.2 Gen wird präferentiell im Myocard und im Hippocampus exprimiert. In Verbindung mit der Untereinheit Kv2.1 werden neuartige funktionelle heteromultimere Kaliumkanäle ausgebildet, die eine hohe Affinität zu Propafenon besitzen. Erfindungsgemäß werden diese neuartigen Kaliumkanäle für Testsysteme verwendet, die geeignet sind, Stoffe zu identifizieren, die Kv2.1/Kv6.2 Kanäle modulieren, öffnen bzw. schließen können und damit als Therapeutika eingesetzt werden können.

DE 198 41 413 C 1

Gegenstand der Erfindung ist ein neues spannungsabhängiges Kaliumkanalprotein. Kv6.2. (SEQ ID NO: 2 und 4). Ferner werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung erstmals heterologe Kaliumkanäle zur Verfügung gestellt, die das Kaliumkanalprotein sowie weitere Kaliumkanaluntereinheiten, wie z. B. das Kv2.1 Protein enthalten. Ferner sind erfindungsgemäß Vektoren eingeschlossen, die die Kaliumkanaluntereinheit Kv6.2 enthalten, sowie diese Vektoren enthaltende Wirtszellen, die die Kaliumkanaluntereinheit bzw. die Kaliumkanäle exprimieren. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner gegen die Kaliumkanaluntereinheit gerichtete Antikörper. Ferner wird erstmals ein Verfahren zum Identifizieren von Substanzen zur Verfügung gestellt, die Kaliumkanäle öffnen, schließen, aktivieren, inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften verändern können. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung dient das Verfahren zum Identifizieren bzw. Auffinden von Antiarrhythmika.

Die Membranen von Säugetierzellen sind für die strukturelle Integrität und die Aktivität von Zellen und Gewebe von großer Bedeutung. Eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen wird von Membran-durchspannenden Ionenkanälen gesteuert. In der Vergangenheit konnten verschiedene Ionenkanäle identifiziert werden, durch die Kalzium, Natrium und/oder Kalium die Zellmembran passieren können.

Die Aktivität von Kaliumkanälen kann entweder durch intrazelluläre Signalstoffe wie cAMP oder durch Potentialdifferenzen an der Zellmembran reguliert werden. Diese Potentialdifferenzen oder Spannungen kommen durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle zustande.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind abhängig je nach des entlang der Zellmembran vorliegenden Potentials geöffnet oder geschlossen. Es sind verschiedene Klassen von spannungsabhängigen Kaliumkanälen bekannt, deren Aufbau in der Regel ähnlich ist. Grundsätzlich bestehen sie aus vier homologen  $\alpha$ -Untereinheiten und vier  $\beta$ -Untereinheiten. Die  $\beta$ -Untereinheiten sind für die Regulation der Aktivität des Kanals wichtig, während die  $\alpha$ -Untereinheiten den eigentlichen funktionellen Kaliumkanal bilden (O. Pongs, Biospektrum 3 (1997) 21–26). Die  $\alpha$ -Untereinheiten gehören zu einer gemeinsamen Gensuperfamilie. Sie besitzen eine vergleichbare zweidimensionale Struktur, aus der eine für Kaliumkanäle typische Membrantopologie hervorgeht (O. Pongs, Physiol. Rev. 72 (1992) 69–88.; L.Y. Jan et al., Nature 371 (1994) 119–122; K.G. Chandy et al., in Handbook of Receptors and Channels ed. R.A. North, Boca Raton 1 (1994) 1–71). Jede  $\alpha$ -Untereinheit besitzt sechs hydrophobe Membran-durchspannende Segmente S1–S6 und zwischen S5 und S6 die sogenannte P-Region, die von der extrazellulären Seite in die Membran eintaucht. Die P-Region hat einen entscheidenden Anteil an der Ausbildung der Kaliumkanalpore. Das S4-Segment enthält mehrere Aminosäuren mit positiven Ladungen, die wahrscheinlich für die Spannungsempfindlichkeit des Kanals einen wesentlichen Beitrag liefern.

Die Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanaluntereinheiten läßt sich in mehrere Unterfamilien unterteilen, von denen die Kv1- bis Kv4-Familien gut charakterisiert sind (W. Stühmer et al., EMBO J. 8 (1989) 3235–3244; B. Albrecht et al., Receptor and Channel 1 (1993) 99–100; J. Rettig et al., EMBO J. 11 (1992) 2473–2486; Serodio et al., J. Neurophysiol. 75 (1996) 2174–2179). Innerhalb der Unterfamilien liegt die Sequenzidentität der einzelnen  $\alpha$ -Untereinheiten untereinander auf der Ebene der Aminosäuren bei  $\geq 60\%$ . Die bisher klonierten  $\alpha$ -Untereinheiten der Familien Kv1 bis Kv4 exprimieren funktionelle Kaliumkanäle in heterologen Expressionssystemen, d. h. nach Injektion von DNA und mRNA in *Xenopus* Oozyten bzw. in Gewebekulturzellen (Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, Human Epithelial Kidney (HEK) 293 Zellen) oder nach Transfektion von Gewebekulturzellen mit für  $\alpha$ -Untereinheiten kodierender DNA in geeigneten Expressionsvektoren wie pcDNA3 (s. u.).

Zusätzlich zu  $\alpha$ -Untereinheiten von Kv1 bis Kv4 sind noch weitere potentielle Kv  $\alpha$ -Untereinheiten bekannt (M.A. Post et al., FEBS 399 (1996) 177–182; J.P. Hugnot et al., EMBO 15 (1996) 3322–3331; A. Castellano et al., J. Neurosci. 17 (1997) 4652–4661; J.A. Drewe et al., J. Neurosci. 12 (1992) 538–548, die zu Kv1 bis Kv4 bezogen auf die Aminosäuren eine Sequenzidentität von  $<60\%$  zeigen. Diese Kanäle wurden als Kv5.1, Kv6.1, Kv7.1, Kv8.1 bezeichnet. Hauptmerkmal dieser  $\alpha$ -Untereinheiten ist, daß sie zwar für Kaliumkanal  $\alpha$ -Untereinheiten typische Sequenzmerkmale enthalten, aber als Homomultimere keine funktionellen Kanäle in heterologen Expressionssystemen ausbilden. Es ist aber möglich, daß diese  $\alpha$ -Untereinheiten zusammen mit  $\alpha$ -Untereinheiten der Kv2 Familie Heteromultimere ausbilden, die funktionell exprimierbar sind, d. h. funktionelle Kaliumkanäle bilden (M.A. Post et al. (a.a.O.); J.P. Hugnot et al. (a.a.O.); A. Castellano et al. (a.a.O.)).

Spannungsabhängige Kaliumkanäle können vielfältige physiologische Aufgaben übernehmen, die von der Regulation des Membranruhepotentials bis hin zur Regulation der Exozytose und Zellproliferation reichen. In erregbaren Zellen haben spannungsabhängige Kaliumkanäle eine wichtige Bedeutung für die Repolarisation der Aktionspotentiale und die Regulation des Schwellenwertes, von dem aus ein Aktionspotential ausgelöst werden kann. Insofern steuert die Aktivität von Kaliumkanälen sowohl die Dauer und Verlaufsform des Aktionspotentials als auch die Aktionspotentialauslösungsfrequenz. Dies gilt auch für die rhythmische Erzeugung von Aktionspotentialen im Herzmuskelgewebe, dem Myocard (R.E. Ten Eick et al., FASEB J. 6 (1992) 2568–2580).

Mehrere distinkte Kaliumkanaltypen sind an der Generierung und Repolarisierung der Aktionspotentiale im Myocard beteiligt. Die von diesen Kanälen generierten Ströme werden als  $I_{TO}$ ,  $I_{KR}$  und  $I_{SK}$  bezeichnet.  $I_{TO}$  ist ein schnell aktivierender transienter Kaliumauswärtsstrom,  $I_{KR}$  ist ein schnell aktivierender, nicht inaktivierender Kaliumauswärtsstrom,  $I_{SK}$  ist ein langsam aktivierender Kaliumauswärtsstrom. Diese Ströme wurden an dissoziierten, in Kultur gehaltenen Myocardzellen gemessen (R.C. Kass und L.C. Freeman, Trends Cardiovasc. Med. 3 (1993) 149–159; D.M. Barry und J.M. Nerbonne, Ann. Rev. Physiol. 58 (1996) 363–394). Die Analyse von erblichen Herzrhythmusstörungen, die zu einem langen QT-Syndrom, d. h. einer verzögerten Repolarisierung des kardialen Aktionspotentials, führen, hat gezeigt, daß der  $I_{SK}$ -Strom im wesentlichen durch KvLQT1/Kv-Kanäle vermittelt wird (M.C. Sanguinetti et al., Nature 384 (1996) 80–83; J. Berhamin et al., Nature 384 (1996) 78–80). HERG/Kv-Kanäle vermitteln Ströme, die zur Nachhyperpolarisierung und damit zur Stabilisierung des Schwellenwertes beitragen (P.L. Smith et al., Nature 379 (1996) 833–836). Pharmakologisch ist es möglich, HERG-Kanäle relativ spezifisch durch Pharmaka wie E-4031 zu blockieren (P.S. Spector et al., Cir. Res. 78 (1996) 499–503). Vermutlich sind Kanäle des Typus Kv1.5 und Kv4.3 sowie die hier beschriebenen Kv2.1/Kv6.2 Kanäle an der Ausbildung des  $I_{TO}$  und  $I_{KR}$  beteiligt (vgl. R.C. Kass und L.C. Freeman, Trends

Cardiovasc. Med. 3 (1993) 149–159; D.M. Barry und J.M. Nerbonne, Ann. Rev. Physiol. 58 (1996) 363–394). Es ist noch nicht bekannt, welche und wieviele Kaliumkanäle insgesamt an der Repolarisierung des kardiakalen Aktionspotentials beteiligt sind.

Herzrhythmusstörungen werden gegenwärtig häufig mit Ionenkanalblockern behandelt. Die Wirkungsweise dieser Blocker läßt sich dahingehend klassifizieren, ob sie die Depolarisierungsgeschwindigkeit (Anstieg) des kardiakalen Aktionspotentials verzögern (z. B. Flecainid, Phenytoin) bzw. die Dauer des kardiakalen Aktionspotentials verlängern (z. B. Sotalol, Aminodaron, Chinidin, Disopyramid) oder aber die Dauer des kardiakalen Aktionspotentials verkürzen (z. B. Lidocain, Mexiletin). Ein wichtiges Präparat ist die Substanz Propafenon (Merck-Index XI 7806), die zu den Antiarrhythmika der Klasse 1c gezählt wird (H. Honjo et al. Br. J. Pharmacol. 97 (1989) 731–738). Propafenon wird bei symptomatischen und behandlungsbedürftigen tachykarden supraventrikulären Herzrhythmusstörungen, wie z. B. AV junctionale Tachykardien, supraventrikuläre Tachykardien bei WPW-Syndrom oder paroxysmales Vorhofflimmern und schwerwiegend symptomatische ventrikuläre tachykarde Herzrhythmusstörungen eingesetzt (J. Braun und R. Preuss. Klinikleitfaden Intensivmedizin, 2. Auflage, Jung Johann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm/Stuttgart (1992)). Die Verabreichung von Propafenon führt, wie in einigen experimentellen Arbeiten beschrieben, nach einem Verschuß der Herzgefäße zu einer verbesserten metabolischen und funktionellen Erholung des Herzens (J.X. Liu et al. Eur. J. Pharmacol. 250/1 (1993) 361–369).

Für den Wirkungsmechanismus von Propafenon wird eine Blockade spannungsabhängiger Natrium-Kanäle angenommen. Propafenon blockiert zusätzlich den L-type Kalzium-Kanal, eine Reihe von Kalium-Kanälen und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren (A.O. Grant J. Cardiovasc. Elektrophysiol. 7 (1996) 353–364). Bei relativ hohen Konzentrationen sind Interaktionen mit den einzelnen Ionenkanälen und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren diskutiert worden (J.C. Hancox und J.S. Mitcheson. Br. J. Pharmacol. 121 (1997) 7–14; B. Koller und M.R. Franz. J. Cardiovasc. Pharmacol. 24 (1994) 753–760; G. Malfatta et al. Eur. Heart J. 14 (1993) 1253–1257). Ein Kanal, für den Propafenon eine hohe Bindungsaffinität hat, ist im Stand der Technik jedoch nicht bekannt.

Propafenon weist jedoch den Nachteil auf, daß beim Patienten vorübergehend Kopfschmerzen, Schwindel, Augenflimmern oder Magen-Darm-Störungen auftreten können (J. Braun und R. Preuss. Klinikleitfaden Intensivmedizin, 2. Auflage, Jung Johann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm/Stuttgart (1992)). Bei älteren Patienten kommen häufig hypotone Kreislaufstörungen vor. Bei stark vorgeschädigtem Myokard können unerwünschte Beeinträchtigungen der Erregungsleitung im HIS-Purkinje-System und der Myokardkontraktilität auftreten (P. Vigreux et al. Therapie 50 (1995) 413–418; P.J. Podrid und J.L. Anderson. Am. J. Cardiol. 15 (1996) 430–434; E. Aliot und I. Denjoy. Am. J. Cardiol. 77 (1996) 66A–71A).

Aufgrund der Nebenwirkungen von Propafenon und anderen im Stand der Technik bekannten Antiarrhythmika wird ständig nach neuen Wirkstoffen gesucht. Das gezielte Screening nach neuen Antiarrhythmika erfolgt in der Pharma-Industrie bislang in der Regel mit Hilfe einer Langendorf-Apparatur. Dabei wird die Funktion eines isolierten Kaninchens- oder Mauseherzens unter entweder einem konstanten Druck oder einem konstanten Fluß gemessen (A. von Bethmann et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153 (1996) A529).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein neues Testsystem (Assay) zur Verfügung zu stellen, das geeignet ist, Stoffe auf ihre Eignung als Antiarrhythmika zu testen, d. h. mit dem getestet werden kann, ob sich Wirkstoffe als Antiarrhythmika eignen. Insbesondere soll der Assay verwendet werden können, um auf einfache Weise gezielt Wirkstoffe daraufhin testen, ob sie die Modulation von  $I_{KR}$ -Strömen ermöglichen. Mit dem Testsystem sollen Pharmaka somit auf ihre Wirkung gegenüber  $I_{KR}$ -Strömen überprüft werden können. Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Testsystem zur Verfügung zu stellen, das den bislang notwendigen Einsatz der Langendorf-Apparatur überflüssig macht oder zumindest stark einschränkt.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch Wirtszellen gelöst, die den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv2.1/Kv6.2 exprimieren.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird überraschenderweise eine neue Untereinheit eines Kaliumkanalproteins, Kv6.2, zur Verfügung gestellt, die in Verbindung mit Kv2.1-Untereinheiten nicht-inaktivierende Kaliumauswärtsströme vermittelt, die aufgrund ihrer Eigenschaften zu  $I_{KR}$ -Strömen beitragen können. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung zeigte es sich, daß die erfindungsgemäßen Kv2.1/Kv6.2-Kanäle hochsensitiv gegen das Klasse IC Herzantiarrhythmikum Propafenon sind. Die erfindungsgemäßen Kaliumkanäle eignen sich in besonderer Weise zur gezielten Identifizierung und Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von Erkrankungen des Herzkreislaufsystems und des Nervensystems in Mensch und Tier, insbesondere von Antiarrhythmika.

Das erfindungsgemäße humane Kaliumkanalprotein weist die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz auf.

Das erfindungsgemäße murine Kaliumkanalprotein weist die in SEQ ID NO: 4 gezeigte Aminosäuresequenz auf.

Erfindungsgemäß eingeschlossen sind auch Homologe, d. h., im Myocard exprimierte Kaliumkanalproteine des Kv6.2 Typs mit mindestens 60% Sequenzidentität, sowie Derivate oder Fragmente der Kaliumkanalproteine, die die gleiche elektrophysiologische, pharmakologische und biologische Wirksamkeit und/oder Immunogenität aufweisen.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die bislang unbekannte Kaliumkanaluntereinheit Kv6.2 im Vorhof des Herzens von Säugern prominent exprimiert wird (siehe Beispiel 7). In Northern Blots von mRNA extrahiert aus verschiedenen humanen Geweben wurde Kv6.2 mRNA zusätzlich noch in Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas und in sehr geringen Mengen in Gehirn, Lunge und Placenta gefunden.

Das erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein sowie Homologe, Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität sind auf verschiedenen, dem Fachmann bekannten Wegen erhältlich. Zum einen können das Kaliumkanalprotein oder Homologe, Derivate oder Fragmente desselben mittels chemischer Synthese hergestellt werden. Desweiteren können Antikörper gegen Fragmente des Polypeptids nach dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt werden (E. Harlow und D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.). Mittels dieser Antikörper kann dann das erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein oder Derivate und Fragmente desselben aus Zellen isoliert werden, die es exprimieren. Dabei kann es sich um Zellen handeln, die natürlicherweise das Kaliumkanalprotein expri-

mieren, es ist aber ebenso denkbar, daß Zellen verwendet werden, in die für das erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein kodierende Nukleinsäuremoleküle eingeführt werden und die das Protein anschließend unter geeigneten Bedingungen exprimieren.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Kaliumkanal, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er mindestens die Kaliumkanaluntereinheit Kv6.2 enthält. Erfindungsgemäß kann der Kaliumkanal neben der Untereinheit Kv6.2 auch andere Kaliumkanaluntereinheiten enthalten. Dabei kommen besonders die Untereinheiten Kv2.1, Kv2.2 und Kv2.3 in Frage. Besonders bevorzugt enthält er zusätzlich die Kaliumkanaluntereinheit Kv2.1. Die spezifischen Eigenschaften des Kaliumkanals hängen von den Kaliumkanaluntereinheiten ab, die er neben Kv6.2 enthält. Enthält er neben Kv6.2 die Kaliumkanaluntereinheit Kv2.1, so handelt es sich um einen spannungsabhängigen Kaliumkanal, der bei Depolarisierung der Membran Auswärtsströme vermittelt.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Nukleinsäuremoleküle, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie für die erfindungsgemäßen Kaliumkanalproteine und Kaliumkanäle, deren Homologe, Derivate und/oder Fragmente mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und Immunogenität kodieren. Besonders bevorzugt können diese erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ausgewählt werden aus

- a) der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz,
- b) syngen oder komplementären Sequenzen der Sequenzen gemäß a), soweit sie für Proteine und Polypeptide mit gleicher elektrobiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität kodieren, und
- c) allelischen Varianten und Fragmenten der Sequenzen gemäß a) und b).

Bestandteil der Erfindung ist ferner ein Vektor, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er eines oder mehrere der oben genannten Nukleinsäuremoleküle enthält. Geeignete Vektoren sind pBluescript KS<sup>+</sup> und pBluescript KS<sup>-</sup> (Stratagene, La Jolla, CA, US), sind aber nicht auf diese beschränkt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Vektor ein Expressionsvektor. Ein geeigneter Expressionsvektor ist pcDNA3 (Invitrogene, Carlsbad, CA, US), die Erfindung ist aber nicht auf diesen beschränkt. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können in diese Vektoren nach allgemein bekannten Methoden kloniert werden (T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, US). Erfindungsgemäß enthalten die Expressionsvektoren Kontrollelemente für Transkription, Transkriptionsstart, Transkriptionsende, mRNA-Prozessierung und Translation, die in den erfindungsgemäß verwendeten Expressionssystemen in aktiver Form vorliegen.

Bevorzugt enthalten die erfindungsgemäßen Vektoren Sequenzen, die die Replikation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle erleichtern. Besonders bevorzugt enthalten sie ferner Sequenzen, die die Integration der Nukleinsäuremoleküle in das Genom einer Wirtszelle erleichtern.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Wirtszellen, die mit den erfindungsgemäßen Vektoren transformiert sind. Besonders bevorzugt sind diese Wirtszellen CHO-Zellen oder Xenopus Oozyten. Als Wirtszellen kommen aber auch andere Eukaryontenzellen aus der Gruppe bestehend aus COS, HEK 293, NIH-3T3 in Frage, sind aber nicht auf diese beschränkt. Von Bedeutung ist, daß die Promotor- und/oder Enhancersequenzen auf die mit den Vektoren transformierten Wirtszellen abgestimmt sind. Dadurch kann eine erhöhte Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide sichergestellt werden.

Ferner ist eine Wirtszelle Gegenstand dieser Erfindung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie neben den erfindungsgemäßen Vektoren zusätzlich mit einem weiteren Vektor transformiert ist, der eine Nukleinsäuresequenz enthält, die für eine andere Kaliumkanaluntereinheit kodiert. Besonders bevorzugt kodiert diese Nukleinsäuresequenz für die Kaliumkanaluntereinheit Kv2.1 (B. Albrecht et al. Receptor and Channel 1 (1993) 99-100). Sie kann aber auch für andere Kaliumkanaluntereinheiten wie Kv2.2 und Kv2.3 kodieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Wirtszelle, die einen funktionellen Kaliumkanal exprimiert, der die Kaliumkanaluntereinheit Kv6.2 enthält. Die erfindungsgemäße Wirtszelle exprimiert den funktionellen Kaliumkanal vorzugsweise auf ihrer Oberfläche, es ist aber ebenso möglich, daß der funktionelle Kaliumkanal in intrazellulären Membranen exprimiert ist.

Erfindungsgemäß eingeschlossen ist ferner ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, die von den erfindungsgemäßen Wirtszellen exprimierten Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren und/oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man

- a) an den erfindungsgemäßen Wirtszellen den Kaliumauswärtsstrom mißt,
- b) die Wirtszellen mit einer zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt und
- c) an den Wirtszellen erneut den Kaliumauswärtsstrom mißt,

wobei der Unterschied zwischen den Kaliumauswärtsströmen vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern umso höher, je niedriger die hinzuzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung der Kaliumauswärtsströme zu erreichen.

Besonders bevorzugt exprimieren die verwendeten Wirtszellen den erfindungsgemäßen Kaliumkanal auf ihrer Oberfläche. Auf diese Weise können die Substanzen dadurch identifiziert bzw. getestet werden, daß man den Ausstrom von Ionen aus den Zellen durch den erfindungsgemäßen Kaliumkanal mißt. Das Ausströmen von Ionen wird bevorzugt mit der "patch-clamp"-Methode (vgl. z. B. O.-P. Hamill et al., Pflügers Arch. (1981) 85-100) durch Anlegen depolarisierender Testpotentiale bestimmt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist ferner eingeschlossen, die erfindungsgemäßen Wirtszellen nach dem Fachmann gut bekannten Methoden mit <sup>86</sup>Rb-Ionen zu beladen, die durch Kaliumkanäle so gut wie Kaliumionen permeieren können. Die beladenen Zellen können in Gegenwart von zu testenden Substanzen kultiviert werden. Danach kann der

Einfluß der Substanzen auf den  $^{86}\text{Rb}$ -Auswärtsstrom der mit  $^{86}\text{Rb}$  beladenen Zellen mit dem Fachmann bekannten Methoden gemessen werden (R.S. Rogowski et al. Mol. Pharmacol 50 (1996) 1167-1177).

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine öffnende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz keine Kaliumauswärtsströme fließen, Kaliumauswärtsströme fließen.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine aktivierende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom verstärkt wird.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine schließende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz Kaliumauswärtsströme fließen, keine Kaliumauswärtsströme fließen.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine inaktivierende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom vermindert wird, ohne daß der Kaliumauswärtsstrom vollständig zum Erliegen kommt.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine verändernde Substanz bezeichnet, wenn durch Zugabe der Substanz biophysikalische Eigenschaften des Kaliumkanals wie Spannungsabhängigkeit, Leitfähigkeit, Aktivierungszeitkonstanten, Inaktivierungszeitkonstanten, Schaltverhalten, Offenzeiten oder Geschlossenzeiten verändert werden.

Änderungen in der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung führen erwartungsgemäß bei Testpotentialen, die Kaliumauswärtsströme hervorrufen, zu einer Stromzunahme oder Stromabnahme. Leitfähigkeitsänderungen führen ebenfalls zu einer Zu- oder Abnahme der Kaliumauswärtsströme. Änderungen der Aktivierungszeitkonstanten führen zu einer Verlangsamung oder Beschleunigung der Aktivierung von Kaliumauswärtsströmen. Änderungen der Inaktivierungszeitkonstanten sowie des Schaltverhaltens können während eines Testpulses zu einer Zunahme oder Abnahme der Auswärtsströme führen. Das gleiche gilt, wenn die Offenzeiten oder Geschlossenzeiten der zu messenden Kaliumkanäle verändert werden (B. Hille, Ionic Channels of Excitable Membranes, 2. Ausgabe (1993), Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA).

Erfindungsgemäß wird eine Substanz auch dann als eine verändernde Substanz bezeichnet, wenn durch Zugabe der Substanz die Zelloberflächenexpression des Kaliumkanals verändert wird. Eine Veränderung der Zelloberflächenexpression führt zu einer Zunahme bzw. Abnahme der zu messenden Kaliumauswärtsströme.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man

- a) an den erfindungsgemäßen Wirtszellen das Membranpotential mißt,
- b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
- c) an den Wirtszellen erneut das Membranpotential mißt,

wobei der Unterschied zwischen dem Membranpotential vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern umso höher, je niedriger die einzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung des Membranpotentials zu erreichen.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man

- a) in den erfindungsgemäßen Wirtszellen das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom mißt,
- b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
- c) das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom erneut mißt,

wobei die Unterschiede zwischen dem Membranpotential und dem Kaliumauswärtsstrom vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern umso höher, je niedriger die einzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung des Membranpotentials sowie des Kaliumauswärtsstromes zu erreichen.

Besonders bevorzugt sind die in den erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Wirtszellen Xenopus Oozyten. Ferner sind erfindungsgemäß CHO Zellen sowie andere Gewebekulturzellen wie COS-Zellen und HEK 293 Zellen bevorzugt, die Auswahl ist aber nicht auf diese beschränkt, solange in den verwendeten Wirtszellen ein funktioneller Kaliumkanal erhalten werden kann.

Überraschenderweise hat es sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung gezeigt, daß funktionelle Kaliumkanäle, welche die Kaliumkanaluntereinheiten Kv6.2 und Kv2.1 enthalten, einen hochaffinen Rezeptor für Propafenon darstellen. Daher eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren unter Verwendung von Wirtszellen, die den Kv2.1/Kv6.2-Kaliumkanal exprimieren, zum Auffinden und Testen von neuen oder bekannten Substanzen und Wirkstoffen, die einen Effekt auf den Herzrhythmus haben. Besonders bevorzugt eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zum Auffinden und Testen von Klasse IC Antiarrhythmika.

Somit ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Identifizierung von Substanzen möglich, die dazu geeignet sind, die erfindungsgemäßen Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern. Aufgrund der spezifischen Lokalisation und Funktion dieser Kanäle können deren Modulatoren (aktivierend oder inaktivierend) in unterschiedlichen kardiovaskulären und neuronalen Bereichen eine Behandlung ermöglichen.

Im kardiovaskulären Bereich sind außer dem Herzrhythmus die Kontraktionskraft und die Herzdurchblutung von Be-

deutung. Modulatoren der erfindungsgemäßen Kaliumkanäle können somit potentiell in der Therapie von Arrhythmien oder Bluthochdruck sowie bei der Cardioprotektion eingesetzt werden.

Im neuronalen Bereich spielen Kaliumkanäle eine entscheidende Rolle in der Regulation der Aktivität von Neuronen. Modulatoren dieser Kaliumkanäle können potentiell Lern- und Gedächtnisfunktionen beeinflussen und beispielsweise bei neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. Epilepsien, Ischämien, Schlaganfall, Morbus Parkinson und Alzheimer) therapeutisch eingesetzt werden.

Ferner werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Antikörper zur Verfügung gestellt, die an das isolierte erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein oder an Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrobiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität binden. Ferner werden Antikörper zur Verfügung gestellt, die an das erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein oder an Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität binden, wobei das Kaliumkanalprotein oder die Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität Bestandteil eines Kaliumkanals sind und somit eine andere dreidimensionale Struktur aufweisen können als die isolierten erfindungsgemäßen Kaliumkanalproteine. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern sind dem Fachmann allgemein bekannt (E. Harlow und D. Lane, a.a.O.). Die Antikörper sind erhältlich, indem man Tiere mit dem erfindungsgemäßen Kaliumkanalprotein oder Derivaten oder Fragmenten desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität immunisiert. Polyklonale Antikörper werden dann aus dem Serum der Tiere gewonnen, während monoklonale Antikörper aus dem Überstand von Hybridomzellen erhältlich sind. Hybridomzellen sind erhältlich, indem man Antikörper produzierende Zellen mit Tumorzellen fusioniert (E. Harlow und D. Lane, a.a.O.).

Erfindungsgemäß eingeschlossen sind auch Spezieshomologe des erfindungsgemäßen humanen Kaliumkanalproteins Kv6.2 sowie deren Derivate und/oder Fragmente mit gleicher Immunogenität. Die Spezieshomologe zeichnen sich dadurch aus, daß sie aus vom Menschen verschiedenen Spezies entstammen und eine Aminosäureidentität von mindestens 60% zum erfindungsgemäßen humanen Kaliumkanalprotein aufweisen und – wie bereits oben beschrieben – zusammen mit anderen Kaliumkanaluntereinheiten Kaliumkanäle bilden, die vorzugsweise Klasse IC Antiarrhythmika binden.

Besonders bevorzugt stammt das Spezieshomologe aus der Maus und weist die in SEQ ID NO: 4 gezeigte Aminosäuresequenz auf.

Die Erfindung wird im folgenden durch Beispiele, Sequenzprotokolle und Figuren verdeutlicht.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1

##### A) Genomische Organisation des humanen Kv6.2 Gens

Die kodierende Region ist schematisch durch zwei Rechtecke dargestellt. Die sieben schwarzen Balken zeigen die sechs hydrophoben, möglicherweise membranspannenden Segmente S1 bis S6 und das an der Porenbildung beteiligte Segment P an. Restriktionsschnittstellen sind wie folgt abgekürzt: EV-EcoRV, P-PstI, S-SacI, B-BamHI. Diese Restriktionsschnittstellen wurden durch einzelne bzw. doppelte Verdauungen und die Sequenzierung lokalisiert. Die Exon-Intron Übergänge (SEQ ID NO: 9 und 13) wurden durch Vergleich der genomischen Sequenz des humanen Kv6.2 mit der humanen Kv6.2 cDNA (hKv6.2 cDNA SEQ ID NO: 1) bzw. der Maus cDNA (mKv6.2 cDNA SEQ ID NO: 3) erhalten. Das humane genomische SacI/PstI-Fragment (Probe A) wurde als Hybridisierungsprobe für die Northern-Analyse in Fig. 2 verwendet. Die gestrichelten Linien verweisen auf die genomischen Sequenzen der Exon-Intron Übergänge. Intronsequenzen sind unterstrichen. Unterhalb der hKv6.2 Sequenz ist die abgeleitete Teilproteinsequenz angegeben. mKv6.2 cDNA und hKv6.2 cDNA zeigt die cDNA-Sequenzen im Bereich der Exon-Intron Übergänge.

B) Konservierte Nucleotid-Sequenzen des humanen Kv6.2 (SEQ ID NO: 1) und des Mus musculus Kv6.2 Gens (SEQ ID NO: 3), aus denen der offene Leserahmen abgeleitet wurde.

Die Striche (-) in der Maus-Sequenz deuten auf zur humanen Sequenz identische Nukleotide hin.

C) Offener Leserahmen der abgeleiteten Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) der humanen Kv6.2  $\alpha$ -Untereinheit. Die sechs hydrophoben, möglicherweise membranspannenden Segmente sind mit S1 bis S6 markiert. Die Markierungen mit PKC und CamK zeigen die putativen Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C und  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin abhängige Kinase II.

D) Homologie (in %) der humanen Kv6.2 Proteinsequenz (SEQ ID NO: 2) zu Proteinsequenzen von repräsentativen Mitgliedern der einzelnen Kv-Unterfamilien aus der Ratte.

Fig. 2

A) Northern-Analyse der Expression humaner Kv6.2 mRNA in verschiedenen Geweben.

Die aufgetragene mRNA ist über der jeweiligen Spur vermerkt. Das humane genomische SacI/PstI-Fragment (SEQ ID NO: 5), das in Fig. 1A als Probe A bezeichnet ist, wurde als Hybridisierungsprobe verwendet. In Herz, Niere, Muskel, Leber und Pankreas wurde eine 5.5 kb große Kv6.2 mRNA detektiert. Die RNA-Menge in den einzelnen Bahnen wurde durch eine Hybridisierung mit einer markierten  $\beta$ -Aktin cDNA Probe kontrolliert.

B) Northern-Analyse der Expression der Kv6.2 mRNA in verschiedenen Geweben der Ratte.

Die Herkunft der aufgetragenen mRNA ist über der jeweiligen Spur vermerkt. Ein genomisches DNA-Fragment (SEQ ID NO: 7), das die DNA-Sequenz von MKv6.2 zwischen Nucleotid 1281–1443 in Fig. 1B beinhaltet, wurde hier als Hybridisierungsprobe benutzt. Eine präferentiell im Herz exprimierte 2.6 kb lange mRNA wurde detektiert. Die RNA Menge in den einzelnen Bahnen wurde durch eine Hybridisierung mit einer markierten  $\beta$ -Aktin cDNA Probe überprüft.



C) Northern-Analyse der Expression der Kv6.2 mRNA innerhalb verschiedenen Regionen des Ratten-Herzens. Die aufgetragenen mRNAs aus verschiedenen Regionen des Ratten-Herzens sind über der jeweiligen Spur vermerkt. Die Kv6.2-Expression in Vorhofkammern ist stärker als in Septum und ventrikularen Kammern.

Fig. 3

5

In situ Hybridisierung und immunocytochemische Lokalisation des mKv6.2-Gens in adultem Maus-Gehirn. Eine 393 bp Antisense-RNA, die Nucleotide 1281–1443 der kodierenden mKv6.2 DNA (Fig. 1B(b), Seq. ID. Nr. 7) repräsentiert, wurde hier für die in situ Hybridisierung an adulten Maus-Gehirn-Schnitten verwendet.

- A) Präferentielle Expression der Kv6.2 mRNA in Körner-Zellen des Gyrus Dentatus und in Pyramiden-Zellen des hippocampalen CA3-Feldes.
- B) Kontrolle mit einer Sense-RNA Probe.
- C) Maus-Gehirn-Schnitt angefärbt mit dem Anti-Kv6.2 Antikörper, wobei eine starke Färbung im Moosfasersystem des Hippocampus gefunden wurde.
- D) Blockierung der in Fig. 3C gezeigten Färbung durch Zugabe von Peptide (Kv6.2 Antigen).

10

15

Fig. 4

Lokalisation des Kaliumkanal-Gens, hKv6.2, in der Region des humanen Chromosoms 18q22–23.

20

Fig. 5

Vergleich der kinetischen Eigenschaften homomultimerer Kv2.1-Kanäle mit denen von Kanälen, die durch die Coexpression von Kv2.1 und Kv6.2  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet werden.

25

- A) Auswärtsströme gemessen mit der "patch-clamp"-Methode an mit hKv2.1 DNA (B. Albrecht et al., Receptor und Channels 1 (1995) 99, EMBL Access. Nr. L02840) oder mit hKv6.2-DNA (SEQ ID NO: 1) transient transfizierten CHO-Zellen bzw. mit hKv2.1-DNA und hKv6.2-DNA cotransfizierten (hKv2.1 + hKv6.2) CHO-Zellen.
- B) Auftragung normalisierter Leitfähigkeiten ( $G/G_{max}$ , Ordinate) für humane Kv2.1-Ströme (gefüllte Kreise) und für coexprimierte humane Kv2.1-Ströme mit humanem Kv6.2 (offene Kreise) gegen das Membranpotential (Abzisse).

30

Jeder Punkt stellt den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von in sechs Experimenten für humanes Kv2.1 und elf Experimenten für das Kv2.1-Kv6.2 Heteromultimer durchgeführten Messungen dar. Durchgezogene Linien stellen die Ausgleichskurven gemäß der Boltzmann-Gleichung dar mit  $V_{0.5} = +10.8 \pm 2.5$  mV für Kv2.1 alleine und  $V_{0.5} = -10 \pm 2.5$  mV für Ströme für Kv2.1 koexprimiert mit Kv6.2  $\alpha$ -Untereinheiten (T-test für zwei Gruppen,  $p < 0.005$ ). Die Steigung zwischen beiden Kurven weist keinen Unterschied auf ( $S = 15.3 \pm 1.5$  für Kv2.1 Homomultimere;  $S = 14.5 \pm 9$  für Kv2.1/Kv6.2 Heteromultimere). Die Koexpression von hKv2.1 und hKv6.2 verschiebt den Spannungsverlauf der Aktivierung um 20 mV zu negativeren Testpotentialen gegenüber hKv2.1 allein.

35

C) Effekt der hKv6.2  $\alpha$ -Untereinheit auf die Inaktivierungskinetik des Kv2.1-vermittelten Auswärtsstroms. Die Wellenformen von Kaliumströmen in CHO-Zellen, die mit Kv2.1 alleine transfiziert worden waren, wurden mit jenen überlagert, die von CHO-Zellen, die mit Kv2.1- und Kv6.2-Untereinheiten kotransfiziert worden waren. Die Depolarisierungspulse wurden bis +40 mV angelegt. Das Haltepotential betrug -80 mV. Die Inaktivierungszeitkonstante für Kv2.1-Ströme beträgt  $\tau = 7.17 \pm 2.1$  msec. ( $n = 4$ ), und für Kv2.1/Kv6.2 coexprimierte Ströme beträgt  $\tau = 4.98 \pm 5$  msec. ( $n = 4$ ). Alle Transfektionen wurden in Gegenwart des Indikators GFP (grün fluoreszierendes Protein, M. Chalfie et al., Science 263 (1994) 802–805, S. Wang und T. Hazelrigg, Nature 369 (1994) 400–403) durchgeführt. Die Transfektionsabläufe und die Bedingungen für das Aufzeichnen von Strömen an ganzen Zellen waren dieselben wie die in Fig. 6 beschriebenen.

40

45

Fig. 6

50

Die Koexpression von hKv2.1 und hKv6.2 verschiebt gegenüber hKv2.1 den Spannungsverlauf der Deaktivierung um 60 mV zu negativeren Testpotentialen.

Beispiele

55

Beispiel 1

Isolierung von Klonen aus humanen und Maus genomischen DNA-Bibliotheken

60

$1 \cdot 10^6$  Plaques einer SVJ129 Maus genomischen DNA-Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA) wurden in 20 NZ-Platten (NZ: 16 g/l NZ-Pulver, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Bacto-Agar; Chemikalien von Gibco BRL, Eggenstein, DE) mit einem Durchmesser 150 mm ausplattiert. Die genomische Phagen-DNA wurde dann auf 20 Membranfilter (Duralon-UV Membran, Stratagene) transferiert. Es folgte eine Hybridisierung der Filter in 50% Formamid, 0.8 M NaCl, 20 mM Pipes (Piperazin-N,N'-bis [2-ethansulfonsäure], Sigma), 1% SDS, 100  $\mu$ g/ml denaturierte Heringssperm-DNA, in  $H_2O$  und mit  $^{32}P$ -markierter Maus Kv3.1 cDNA (Nucleotid 223–1356, Access. No. Y07521, Yokoyama et al., 1989) als Probe. Diese Hybridisierung wurde bei 60°C für 18 Stunden durchgeführt. Die Filter wurden anschließend mit 0.1xSET/0.1% SDS in  $H_2O$  (20xSET: 3 M NaCl, 400 mM Tris/HCl, pH 7.4, 200 mM EDTA; Chemikalien von Sigma, für 0.1xSET wird 20xSet

65

1 : 200 verdünnt) gewaschen. Nach erfolgter Autoradiographie bei  $-70^{\circ}\text{C}$  wurden die auf den Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, N.Y.) sichtbaren Signale den entsprechenden Plaques auf den Platten zugeordnet.

Die genomischen DNA-Fragmente wurden aus den positiven Phagen-Klonen isoliert und dann mit *SacI*, *XbaI*, *EcoRI*, *BamHI* und *PstI* sowohl einzeln als auch doppelt verdaut. Die verdauten DNA-Fragmente wurden in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und dann auf Nylonmembran transferiert. Drei DNA-Fragmente wurden durch eine weitere Hybridisierung, durchgeführt wie oben, identifiziert. Dies waren ein 1.0 kb *BamHI/SacI* Fragment, ein 1.0 kb *XbaI/SacI* Fragment und ein 0.9 kb *SacI/PstI* Fragment. Die Sequenzierungen der drei DNA-Fragmente zeigte, daß sie zusammen den gesamten kodierenden Bereich für Kv6.2 enthielten.

Die drei isolierten genomischen Maus DNA Fragmente wurden dann für die Isolierung des humanen Kv6.2-Gens als Hybridisierungssonden verwendet, wobei  $1 \cdot 10^6$  Phagen-Plaques aus einer humanen genomischen DNA-Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA) ausplattiert wurden. Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen waren wie oben beschrieben. Nach Southern-Analyse und Sequenzierung wurden drei humane genomische Fragmente erhalten: ein 1.5 kb *SacI/EcoRV* Fragment, ein 0.8 kb *PstI/SacI* Fragment und ein 0.8 kb *SacI/BamHI* Fragment (Fig. 1A), die zusammen den gesamten kodierenden Bereich für Kv6.2 (Fig. 1C) enthielten.

#### Beispiel 2

##### Kartierung der Restriktionsschnittstellen innerhalb des isolierten genomischen DNA-Bereichs

Zur Erzeugung einer Restriktionskarte wurden die Insertionen der isolierten genomischen Phagen-DNAs mit Restriktionsenzymen nach Standardmethoden einfach oder doppelt verdaut und die Fragmente wurden anschließend in den Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (T. Maniatis et al., a.a.O.). Längenvergleiche der verdauten DNA-Fragmente ermöglichten die Erstellung der Restriktionskarten der isolierten genomischen Regionen (siehe Fig. 1A). Die DNA-Fragmente, die den kodierenden Bereich des Kv6.2-Gens beinhalten, wurden mit dem Fachmann bekannten Methoden durch Southern-Analysen (T. Maniatis et al., a.a.O., E.M. Southern, J. Mol. Biol. 98(1975) 503-517) innerhalb der isolierten genomischen Regionen lokalisiert. Die Sequenzierungen dieser DNA-Fragmente ermöglichten die Identifizierung der Transkriptionsrichtung des Kv6.2-Gens.

#### Beispiel 3

##### DNA-Sequenzierung

Die DNA-Fragmente, die dem kodierenden Bereich des Kv6.2-Gens entsprachen, wurden in die *EcoRI*-Schnittstellen des Bluescript Vektors (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert. Die Kv6.2 DNA wurde dann nach der Methode von Sanger et al., (P.N.A.S. USA 74 (1977) 5463-5467) mit T7-DNA Polymerase (Sequenase, US Biochemicals, Cleveland, Ohio) sequenziert. Plasmid-spezifische Oligonukleotide M13, Reverse, T3 und T7 (Stratagene, La Jolla, CA, SEQ ID Nos: 23-26) wurden für die Sequenzierungen als Primer verwendet.

#### Beispiel 4

##### Northern-Analyse

Der Multiple Tissue Northern (MTN) blot (Clontech, Palo Alto, CA) enthielt jeweils 2 mg poly-A<sup>+</sup> mRNA aus Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas. Das 0.6 kb *SacI/PstI*-Fragment (Probe A in Fig. 1A) wurde <sup>32</sup>P-markiert (T. Maniatis et al., a.a.O.) und dann als Hybridisierungssonde verwendet. Die Sonde wurde in Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5xSET, 10x Denhardt's (100x Denhardt's: 20 g/l Ficoll 400 (Sigma), 20 g/l BSA (Sigma), 20 g/l Polyvinylpyrrolidon (Merck), 1 : 10 verdünnt), 1% SDS (Biorad), 100 mg/ml Heringssperm DNA (Sigma) in H<sub>2</sub>O) bei 42°C 24 Stunden an die mRNA hybridisiert. Der Blot wurde anschließend nacheinander in Waschlösung 1 (2xSSC (20xSSC: 173 g/l NaCl, 88,2 g/l NaCitrat, pH 7,0, alle Chemikalien von Sigma, für 2xSSC 1 : 10 verdünnt); 0.1% SDS; in H<sub>2</sub>O) bei RT und in Waschlösung 2 (0.1xSSC (20xSSC 1 : 200 verdünnt; 0.1% SDS; in H<sub>2</sub>O) bei 50°C gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte eine Autoradiographie auf den Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, N.Y.) bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Der zweite Multiple Tissue Northern (MTN) blot (Clontech, Palo Alto, CA) enthielt jeweils 2 mg poly-A<sup>+</sup> mRNA aus Ratten-Herz, -Gehirn, -Milz, -Lunge, -Leber, -Skelettmuskel, -Niere und -Testis. Der Northern blot mit RNA aus Ratten-Herz enthielt jeweils 5 mg poly-A<sup>+</sup> mRNA aus linkem Vorhof, rechten Vorhof, Septum, linker ventrikulärer Kammer und rechter ventrikulärer Kammer. Das 1.2 kb *SacI/SacI* genomische Maus DNA-Fragment wurde <sup>32</sup>P-markiert und dann als Hybridisierungssonde für die beiden Blots verwendet. Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen sowie die Autoradiographiebedingungen entsprachen denen des ersten MTN-Blots.

#### Beispiel 5

##### PCR

Die Verknüpfung der zwei kodierenden Bereiche des humanen Kv6.2-Gens wurde durch eine Kombination von PCR-Technik und Verdauung mit der Typ IIS Restriktionsendonuklease *Eam* 1104I durchgeführt (K.A. Padgett et al., Gene 168 (1996) 31-35). Der erste 624 bp kodierende Bereich für N-Terminus und S1-Segment (Nukleotide 1-624 von Seq. ID. Nr. 1) wurde durch PCR mit zwei Oligonukleotiden *Seam*1 (SEQ ID NO: 17) und *Seam*6 (SEQ ID NO: 19) amplifiziert, wobei das 1.2 kb große genomische humane *SacI/EcoRV* DNA-Fragment als Matrize verwendet wurde. Eine Ko-

zak-Sequenz (5'-CCACC-3', SEQ ID NO: 27) wurde vor das Start-Codon in das Seam1 Oligonukleotid eingebaut. Der zweite 777 bp kodierende Bereich für S2-S6 Segmente und C-Terminus (Nukleotide 625-1401 von Seq. ID. Nr. 1) wurde durch eine zweite PCR mit Oligonukleotiden Seam5 (SEQ ID NO: 20) und Seam4 (SEQ ID NO: 22) amplifiziert, wobei das 1.6 kb PstI/BamHI genomische humane DNA-Fragment (Fig. 1A) als Matrize verwendet wurde. Für die beiden Amplifikationen wurde insgesamt 14 Reaktionszyklen mit KlenTaq Polymerase (Clontech, Palo Alto, CA) durchgeführt, wobei die methylierten Deoxycytosintriphosphate (dCTPs, Stratagene) in das DNA-Fragment durch Zugabe von 5'-Methyl-dCTP in den letzten fünf Reaktion-Zyklen eingebaut wurden. Die anschließende Verdauung mit Eam 1104I (Stratagene, La Jolla, CA) erzeugte komplementäre überhängende Enden am 3'-Ende des ersten PCR-Fragments (CCC) und am 5'-Ende des zweiten PCR-Fragments (GGG). Das eingebaute methylierte dCTP verhinderte die Verdauung der internen Eam 1104I Schnittstellen in den PCR-Fragmenten. Durch Ligation mit T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, Buffalo, NY) wurden die beiden PCR-Fragmente miteinander verknüpft. Es resultierte ein DNA-Fragment mit dem gesamten kodierenden Bereich des humanen Kv6.2-Gens.

#### Beispiel 6

##### Humane chromosomale Lokalisation

Ein 14 kb langer humaner genomischer  $\lambda$ DNA-Klon, der den kodierenden Bereich für S2-S6 und C-Terminus der Kv6.2  $\alpha$ -Untereinheit enthielt, wurde mit Biotin-16-dUTP (Boehringer, Mannheim) markiert und dann für eine FISH-Analyse als Sonde verwendet. Die FISH-Analyse erfolgte nach der von P. Lichter et al., PNAS USA 85 (1988) 9664-9668 und C. Fonatsch et al., Int. J. Cancer 26 (1980) 749-754 beschriebenen Methode. Die Signale wurden mit Fluoreszenz-Isothiozyanat gekoppeltem Avidin-DCS<sup>®</sup> (Vector Laboratories) detektiert und die Lokalisierung der Signale in Metaphase-Chromosomen wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (C. Zeiss, LSM 410, Germany) durchgeführt.

#### Beispiel 7

##### In situ Hybridisierung und Immunozytochemie

Das 393 bp lange DNA-Fragment (Nukleotide 1-393 von SEQ ID NO: 7) aus dem 0.9 kb Maus SacI/PstI-DNA-Fragment wurde in den Blueskript Vektor umklontiert. Zwei linealisierte DNA-Klone mit dieser Insertion in zwei verschiedenen Orientierungen wurden für die Synthesen von Anti-Sense-RNA und Sense-RNA mit Hilfe des mMessageMachine Kits (Ambion, Austin, TX) verwendet, wobei die RNAs mit Hilfe von T<sub>3</sub>- bzw. T<sub>7</sub>-RNA-Polymerase synthetisiert und dabei mit <sup>33</sup>P-UTP markiert wurden (Melton et al., Nucleic Acids Res. 12 (1984) 7035-7056).

In einem Kryostaten wurden 10-16  $\mu$ m dicke Gefrierschnitte angefertigt und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Min. in eiskalter, PBS gepufferter, 4%ige Formalin-Lösung fixiert. Die Hybridisierungen mit den <sup>33</sup>P-markierten Antisense- und Sense-RNAs erfolgten in Hybridisierungslösung (50% Formamid (Fluka), 10% Dextransulfat (Sigma), 0.3 M NaCl (Sigma), 20 mM Tris/HCl (Sigma, pH = 7.4), 5 mM EDTA (Sigma), 20 mM DTT (Dithiothreitol, Sigma), 1x Denhardt's Reagenz (100x Denhardt's 1 : 100 verdünnt), 100  $\mu$ g/ml denaturierte Lachsperma-DNA, 200  $\mu$ g/ml Hefe-tRNA) unter einem Deckgläschen über Nacht bei 42°C. Die Schnitte wurden dann in 1xSSC/4 mM DTT bei 55-65°C gewaschen. Die Objektträger wurden dann über 1xSSC/4 mM DTT, 0.1xSSC, 75% Ethanol entwässert und luftgetrocknet. Die Exposition erfolgte für 3-7 Tage bei Raumtemperatur mit MR-Film (Kodak, Rochester, NY). Die Schnitte wurden dann in auf 42°C vorgewärmte Photoemulsion (Kodak, Rochester, NY) getaucht, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und für 1 Woche bei 4°C exponiert. Die Entwicklung erfolgte mit D19-Entwickler und Unifix (Kodak, Rochester, NY).

Für die Erzeugung der Antigen-Peptide wurde das 393 bp DNA-Fragment (Nukleotide 1-393 von SEQ ID NO: 7) aus dem 0.9 kb genomischen SacI/PstI Maus-DNA-Fragment isoliert und dann in den kodierenden Leserahmen des Glutathion-S-Transferase (GST) Gens im pGEX-2T Vektor (D.B. Smith und K.S. Johnson, Gene 67 (1988) 31-40) umklontiert. Dieses DNA-Fragment enthielt den kodierenden Bereich für den C-Terminus der mKv6.2  $\alpha$ -Untereinheit (C-mKv6.2, SEQ ID NO: 8). Das Fusionsprotein von GST und C-mKv6.2 wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropylthiogalactosid, Gibco-BRL) in dem mit dieser Plasmid-DNA transformierten E.coli-Bakterienstamm XL-1 Blue (Stratagene) induziert und dann durch Glutathion-Agarose (Sigma, St. Louis, MO) aufgereinigt. Zwei ca. 4-5 Monate alte weibliche Kaninchen wurden mit diesem Fusionsprotein nach der Standard-Methode (E. Harlow und D. Lane, a.a.O.) immunisiert. Für die Affinitätsreinigung des Anti-Kv6.2 Antikörpers wurde C-mKv6.2 mit einem His-Tag im Bakterienstamm BL21 induziert, der den pET-16b Vektor (Novagen, Madison, WI, F.W. Studier et al., Methods in Enzymology 185 (1990) 60-89) mit dem 393 bp DNA-Fragment (Nukleotide 1-393 von Seq. ID. Nr. 7) enthielt. Die Aufreinigung des C-mKv6.2-Proteins mit His-Tag wurde durch eine Nickel-Säule (Novagen, Madison, WI) durchgeführt. Ca. 100  $\mu$ g aufgereinigtes C-mKv6.2-Protein wurde auf eine 1 cm<sup>2</sup> große Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, Keen, NII) gebunden und dann zwei Stunden lang mit 1xPBS Lösung mit 5% Milchpulver bei Raumtemperatur blockiert. Die erhaltene Membran wurde in der PBS-Lösung mit 1 : 5 verdünntem Kaninchen-Antiserum über Nacht bei 4°C inkubiert und dann einmal in der Waschlösung 1 (1xPBS (20xPBS: 3 M NaCl, 161 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 39 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 : 20 verdünnt), 1% BSA (Sigma), 0.5% Triton X-100 (Sigma)) und zweimal in der Waschlösung 2 (1xPBS, 1% BSA) gewaschen. Die Elution erfolgte in einer Elutionslösung (0.2 M Glycin, 0.15 M NaCl, 0.1% BSA, pH=2.5).

Adulte Mäuse wurden betäubt und mit einer Lösung aus 4% Formaldehyd, 0.05% Glutaraldehyd und 0.2% Pikrinsäure in 0.1 M Phosphatpuffer (pH=7.4) perfundiert. Nach der Fixierung wurde mit 0.15 M Saccharose in 0.13 M Phosphatpuffer (pH=7.4) gespült, das Gehirn wurde herausoperiert und auf -50°C eingefroren. 25  $\mu$ m dicke Gefrierschnitte wurden dann bei -21°C angefertigt. Die Schnitte wurden 30 min bei Raumtemperatur mit 1% NaBH<sub>4</sub> in PBS reduziert und dann mit PBS gewaschen. Zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte für 30 Minuten bei

RT mit 0.05% Phenylhydrazin und 10% normales Ziege-Serum (Gibco-BRL) mit 0.3% Triton x-100 behandelt. Die Schnitte wurden mit dem 1 : 50 verdünnten gereinigten Anti-C-mKv6.2 Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Für das Peptid-Blockierungsexperiment wurde dieser Antikörper in einer 10 µg/ml Antigen-Peptidlösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur präinkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur mit der Zweitantikörperlösung (biotinylierter Ziege-Kaninchen Antikörper, 1 : 2000 in PBS, Camon) inkubiert und anschließend mit dem Elite-ABC-Komplex (Vectastain Elite-ABC Kit, Vector) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin wurde in 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 3 min durchgeführt (S.M. Hsu et al., J. Histochem. Cytochem. 29 (1981) 577-580).

#### Beispiel 8

#### Funktionelle Expression und elektrophysiologische Technik

Das DNA-Fragment (SEQ ID NO: 1), das den gesamten kodierenden Bereich für die hKv6.2  $\alpha$ -Untereinheit enthielt, wurde in den dem Fachmann gut bekannten pCDNA3 Vektor (Invitrogene, Carlsbad, CA) zu Expressionsstudien kloniert. hKv2.1 cDNA auch in einen anderen pCDNA3 Vektor (Invitrogene, Carlsbad, CA) inseriert. Insgesamt 1 µg Plasmid-DNA (entweder Kv2.1, Kv6.2 allein oder Kv2.1 mit Kv6.2 zusammen) und lag DNA für GFP wurde zur Transfektion von CHO-Zellen mit DMRIE-C-Reagens (eine 1 : 1 Mischung aus Kation-Lipid DMRIE und Cholesterol, Gibco-BRL, Life Technologies) eingesetzt. 500 ml Opti-MEM 1-Medium (Gibco-BRL, Life Technologies) mit 2 µg Plasmid-DNA und 500 ml Opti-MEM 1-Medium mit 6.4 µl DMRIE-C-Reagens wurden zusammengemischt, und anschließend bei RT für 45 Minuten inkubiert, wobei ein Liposom-DNA-Komplex gebildet wurde.  $2 \cdot 10^5$  CHO-Zellen in einer 35-mm Schale wurden zuerst mit Opti-MEM 1-Medium gewaschen, danach wurde die Lösung mit diesem Lipid-DNA-Komplex auf die Zellschicht ausplattiert. Nach einer Inkubation für 5-6 Stunden bei 37°C in einem Inkubator unter 5% CO<sub>2</sub> wurde die Lösung durch normales Medium ersetzt, und die Zellen wurden für weitere 12-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden  $5 \cdot 10^4$  Zellen in eine neue Schale (35 mm) für die elektrophysiologischen Messungen umgesetzt.

Auswärtsströme wurden 24-48 Stunden nach der Transfektion mit Hilfe der whole-cell Konfiguration der patch-clamp Technik (O.P. Hamill et al., Pflügers Arch. (1981) 85-100) gemessen. Die Mikropipetten wurden mit einem DMZ-Universal Puller (Zeitz Instruments, Augsburg, Germany) gezogen und hatten einen Widerstand zwischen 2-3 MΩ nach der Füllung mit der intrazellulären Lösung (105 mM Kaliumaspartat, 20 mM KCl, 10 mM BAPTA, 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Glukose, 2 mM ATP-Na<sub>2</sub>, pH=7.2, alle Chemikalien von Sigma). Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die CHO-Zellen zuerst in einer extrazellulären Lösung (140 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM Glukose, pH=7.3) auf einem Haltepotential -80 mV gehalten und anschließend depolarisiert auf Testpotentiale von -70 bis 80 mV in Abstände von 10 mV von je 300 ms Dauer.

# DE 198 41 413 C 1

## SEQUENZPROTOKOLL

### (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

#### (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Forschungsgesellschaft Genion mbH
- (B) STRASSE: Abteistr. 57
- (C) ORT: Hamburg
- (D) BUNDESLAND: Hamburg
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 20149

#### (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neuer spannungsabhängiger Kaliumkanal und seine Verwendung zur Entwicklung von Therapeutika

#### (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 27

#### (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

### (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

#### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1401 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

#### (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

#### (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

#### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..1401
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Reifes humanes Kv6.2 Protein"

#### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG	GAG	CCA	TGG	CCC	TGC	TCC	CCG	GGC	GGC	GGC	GGC	GGG	ACC	CGC	GCC	48
Met	Glu	Pro	Trp	Pro	Cys	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Ala	45
1				5				10					15			
CGG	CAC	GTC	ATC	ATC	AAC	GTG	GGC	GGC	TGC	CGC	GTG	CGC	CTG	GCA	TGG	96
Arg	His	Val	Ile	Ile	Asn	Val	Gly	Gly	Cys	Arg	Val	Arg	Leu	Ala	Trp	50
			20				25						30			
GCC	GCG	CTG	GCG	CGA	TGC	CCC	CTC	GCG	CGC	CTG	GAG	CGC	CTG	CGC	GCC	144
Ala	Ala	Leu	Ala	Arg	Cys	Pro	Leu	Ala	Arg	Leu	Glu	Arg	Leu	Arg	Ala	
			35				40					45				
TGC	CGC	GGC	CAC	GAC	GAC	CTG	CTG	CGC	GTG	TGT	GAC	GAC	TAC	GAC	GTG	192
Cys	Arg	Gly	His	Asp	Asp	Leu	Leu	Arg	Val	Cys	Asp	Asp	Tyr	Asp	Val	55
		50				55					60					

# DE 198 41 413 C 1

	AGC	CGC	GAC	GAG	TTC	TTC	TTC	GAC	CGC	AGC	CCG	TGC	GCC	TTC	CGC	GCC	240
	Ser	Arg	Asp	Glu	Phe	Phe	Phe	Asp	Arg	Ser	Pro	Cys	Ala	Phe	Arg	Ala	
	65					70					75					80	
5	ATC	GTG	GCG	CTT	TTG	CGC	GCA	GGG	AAG	CTG	CGA	CTG	CTG	CGG	GGC	CCG	288
	Ile	Val	Ala	Leu	Leu	Arg	Ala	Gly	Lys	Leu	Arg	Leu	Leu	Arg	Gly	Pro	
					85					90					95		
10	TGC	GCG	CTG	GCC	TTC	CGC	GAC	GAG	CTG	GCC	TAC	TGG	GGC	ATC	GAC	GAG	336
	Cys	Ala	Leu	Ala	Phe	Arg	Asp	Glu	Leu	Ala	Tyr	Trp	Gly	Ile	Asp	Glu	
				100					105					110			
15	GCG	CGC	CTG	GAG	CGC	TGC	TGC	CTG	CGC	CGC	CTG	CGC	CGC	CGC	GAG	GAG	384
	Ala	Arg	Leu	Glu	Arg	Cys	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Arg	Arg	Arg	Glu	Glu	
			115					120					125				
20	GAG	GCG	GCC	GAG	GCC	CGC	GCG	GGG	CCG	ACG	GAG	CGC	GGG	GCG	CAG	GGG	432
	Glu	Ala	Ala	Glu	Ala	Arg	Ala	Gly	Pro	Thr	Glu	Arg	Gly	Ala	Gln	Gly	
		130					135					140					
25	AGC	CCG	GCG	CGC	GCC	CTG	GGA	CCT	CGG	GGG	CGG	CTG	CAG	CGC	GGC	CGG	480
	Ser	Pro	Ala	Arg	Ala	Leu	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Gln	Arg	Gly	Arg	
	145					150					155					160	
30	CGG	CGC	CTG	CGC	GAC	GTG	GTG	GAC	AAC	CCG	CAC	TCG	GGG	CTG	GCG	GGC	528
	Arg	Arg	Leu	Arg	Asp	Val	Val	Asp	Asn	Pro	His	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	
					165					170					175		
35	AAG	CTC	TTC	GCC	TGC	GTG	TCC	GTG	TCC	TTC	GTG	GCC	GTC	ACG	GCC	GTG	576
	Lys	Leu	Phe	Ala	Cys	Val	Ser	Val	Ser	Phe	Val	Ala	Val	Thr	Ala	Val	
				180					185					190			
40	GGC	CTC	TGC	CTG	AGC	ACC	ATG	CCG	GAC	ATC	CGC	GCC	GAG	GAG	GAG	CGG	624
	Gly	Leu	Cys	Leu	Ser	Thr	Met	Pro	Asp	Ile	Arg	Ala	Glu	Glu	Glu	Arg	
			195					200					205				
45	GGC	GAG	TGC	TCC	CCC	AAG	TGC	CGC	AGC	CTG	TTC	GTG	CTG	GAG	ACC	GTG	672
	Gly	Glu	Cys	Ser	Pro	Lys	Cys	Arg	Ser	Leu	Phe	Val	Leu	Glu	Thr	Val	
		210					215					220					
50	TGC	GTG	GCC	TGG	TTC	TCC	TTC	GAG	TTC	CTG	CTG	CGC	TCC	CTG	CAG	GCC	720
	Cys	Val	Ala	Trp	Phe	Ser	Phe	Glu	Phe	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Ala	
						230				235						240	
55	GAG	AGC	AAG	TGC	GCC	TTC	CTG	CGC	GCG	CCA	CTC	AAC	ATC	ATT	GAC	ATC	768
	Glu	Ser	Lys	Cys	Ala	Phe	Leu	Arg	Ala	Pro	Leu	Asn	Ile	Ile	Asp	Ile	
					245					250					255		
60	CTG	GCG	CTC	CTG	CCG	TTC	TAC	GTG	TCG	CTG	CTG	CTG	GGG	CTG	GCG	GCA	816
	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Phe	Tyr	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Ala	
				260				265						270			
65	GGC	CCG	GCG	GGG	ACC	AAG	CTC	CTG	GAG	CGC	GCG	GGG	CTG	GTG	CTG	CGG	864
	Gly	Pro	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Leu	Glu	Arg	Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Arg	
			275					280					285				
70	CTG	CTG	CGT	GCG	CTG	CGC	GTG	CTC	TAC	GTG	ATG	CGC	CTG	GCG	CGC	CAC	912
	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Arg	Val	Leu	Tyr	Val	Met	Arg	Leu	Ala	Arg	His	
			290				295					300					
75	TCG	CTG	GGG	CTG	CGT	TCG	CTG	GGC	CTG	ACC	ATG	CGC	CGC	TGC	GCG	CGC	960
	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Gly	Leu	Thr	Met	Arg	Arg	Cys	Ala	Arg	
			305			310				315						320	
80	GAG	TTC	GGG	CTG	CTG	CTG	CTG	TTC	CTC	TGC	GTG	GCC	ATG	GCG	CTC	TTC	1008
	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Cys	Val	Ala	Met	Ala	Leu	Phe	
					325					330					335		

# DE 198 41 413 C 1

GCG CCA CTG GTG CAC CTG GCC GAG CGC GAG CTG GGC GCG CGC CGC GAC	1056	
Ala Pro Leu Val His Leu Ala Glu Arg Glu Leu Gly Ala Arg Arg Asp		
340 345 350		
TTC TCC AGC GTG CCC GCC AGC TAT TGG TGG GCC GTC ATC TCC ATG ACC	1104	5
Phe Ser Ser Val Pro Ala Ser Tyr Trp Trp Ala Val Ile Ser Met Thr		
355 360 365		
ACC GTG GGC TAC GGC GAC ATG GTC CCG CGC AGC CTG CCC GGG CAG GTG	1152	10
Thr Val Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Arg Ser Leu Pro Gly Gln Val		
370 375 380		
GTG GCG CTC AGC AGC ATC CTC AGC GGC ATC CTG CTC ATG GCC TTC CCG	1200	15
Val Ala Leu Ser Ser Ile Leu Ser Gly Ile Leu Met Ala Phe Pro		
385 390 395 400		
GTC ACC TCC ATC TTC CAC ACC TTT TCG CGC TCC TAC TCC GAG CTC AAG	1248	20
Val Thr Ser Ile Phe His Thr Phe Ser Arg Ser Tyr Ser Glu Leu Lys		
405 410 415		
GAG CAG CAG CAG CGC GCG GCC AGC CCC GAG CCG GCC CTG CAG GAG GAC	1296	
Glu Gln Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu Gln Glu Asp		
420 425 430		
AGC ACG CAC TCG GCC ACA GCC ACC GAG GAC AGC TCG CAG GGC CCC GAC	1344	25
Ser Thr His Ser Ala Thr Ala Thr Glu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Asp		
435 440 445		
AGC GCG GGC CTG GCC GAC GAC TCC GCG GAT GCG CTG TGG GTG CGG GCA	1392	30
Ser Ala Gly Leu Ala Asp Asp Ser Ala Asp Ala Leu Trp Val Arg Ala		
450 455 460		
GGG CGC TGA	1401	
Gly Arg *		
465		35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 467 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Glu Pro Trp Pro Cys Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Thr Arg Ala		
1 5 10 15		
Arg His Val Ile Ile Asn Val Gly Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp		50
20 25 30		
Ala Ala Leu Ala Arg Cys Pro Leu Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Ala		
35 40 45		55
Cys Arg Gly His Asp Asp Leu Leu Arg Val Cys Asp Asp Tyr Asp Val		
50 55 60		
Ser Arg Asp Glu Phe Phe Phe Asp Arg Ser Pro Cys Ala Phe Arg Ala		60
65 70 75 80		
Ile Val Ala Leu Leu Arg Ala Gly Lys Leu Arg Leu Leu Arg Gly Pro		
85 90 95		65

# DE 198 41 413 C 1

Cys Ala Leu Ala Phe Arg Asp Glu Leu Ala Tyr Trp Gly Ile Asp Glu  
 100 105 110  
 5 Ala Arg Leu Glu Arg Cys Cys Leu Arg Arg Leu Arg Arg Arg Glu Glu  
 115 120 125  
 Glu Ala Ala Glu Ala Arg Ala Gly Pro Thr Glu Arg Gly Ala Gln Gly  
 130 135 140  
 10 Ser Pro Ala Arg Ala Leu Gly Pro Arg Gly Arg Leu Gln Arg Gly Arg  
 145 150 155 160  
 Arg Arg Leu Arg Asp Val Val Asp Asn Pro His Ser Gly Leu Ala Gly  
 165 170 175  
 15 Lys Leu Phe Ala Cys Val Ser Val Ser Phe Val Ala Val Thr Ala Val  
 180 185 190  
 20 Gly Leu Cys Leu Ser Thr Met Pro Asp Ile Arg Ala Glu Glu Glu Arg  
 195 200 205  
 Gly Glu Cys Ser Pro Lys Cys Arg Ser Leu Phe Val Leu Glu Thr Val  
 210 215 220  
 25 Cys Val Ala Trp Phe Ser Phe Glu Phe Leu Leu Arg Ser Leu Gln Ala  
 225 230 235 240  
 Glu Ser Lys Cys Ala Phe Leu Arg Ala Pro Leu Asn Ile Ile Asp Ile  
 245 250 255  
 30 Leu Ala Leu Leu Pro Phe Tyr Val Ser Leu Leu Leu Gly Leu Ala Ala  
 260 265 270  
 Gly Pro Gly Gly Thr Lys Leu Leu Glu Arg Ala Gly Leu Val Leu Arg  
 275 280 285  
 35 Leu Leu Arg Ala Leu Arg Val Leu Tyr Val Met Arg Leu Ala Arg His  
 290 295 300  
 40 Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Gly Leu Thr Met Arg Arg Cys Ala Arg  
 305 310 315 320  
 Glu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Phe Leu Cys Val Ala Met Ala Leu Phe  
 325 330 335  
 45 Ala Pro Leu Val His Leu Ala Glu Arg Glu Leu Gly Ala Arg Arg Asp  
 340 345 350  
 Phe Ser Ser Val Pro Ala Ser Tyr Trp Trp Ala Val Ile Ser Met Thr  
 355 360 365  
 50 Thr Val Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Arg Ser Leu Pro Gly Gln Val  
 370 375 380  
 55 Val Ala Leu Ser Ser Ile Leu Ser Gly Ile Leu Leu Met Ala Phe Pro  
 385 390 395 400

60

65



# DE 198 41 413 C 1

Val Thr Ser Ile Phe His Thr Phe Ser Arg Ser Tyr Ser Glu Leu Lys  
 405 410 415  
 Glu Gln Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu Gln Glu Asp  
 420 425 430  
 Ser Thr His Ser Ala Thr Ala Thr Glu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Asp  
 435 440 445  
 Ser Ala Gly Leu Ala Asp Asp Ser Ala Asp Ala Leu Trp Val Arg Ala  
 450 455 460  
 Gly Arg \*  
 465

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1446 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

### (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

### (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Maus

### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..1446
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Reifes murines Kv6.2 Protein"

### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATG GCC CGG CTC CTG GGG CAC CCG GAG GCC CCC GAC GCG GAA CCT GGC  
 Met Ala Arg Leu Leu Gly His Pro Glu Ala Pro Asp Ala Glu Pro Gly  
 470 475 480  
 AGC GCA GGC CGA CAG GGC CGT GGC GGC CGC GGG GCC CGG GCG CGC CAC  
 Ser Ala Gly Arg Gln Gly Arg Gly Gly Arg Gly Ala Arg Ala Arg His  
 485 490 495  
 GTC GTT ATC AAC ATC TGG GGC TGC AGG GTG CGT CTG GCC TGG GCC GCG  
 Val Val Ile Asn Ile Trp Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp Ala Ala  
 500 505 510 515  
 CTG GCC CGC TGT CTC CTG GCG CGC CTC GAG CGC CTG CGA ACC TGC CGC  
 Leu Ala Arg Cys Leu Leu Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Thr Cys Arg  
 520 525 530  
 GGC CAC GAG AAA CTG CTG CGC GTG TGT TAC GAC TAC GAC ATG AGC CGC  
 Gly His Glu Lys Leu Leu Arg Val Cys Tyr Asp Tyr Asp Met Ser Arg  
 535 540 545  
 GAC AAA TTC TTC TTC GAA GGC AGC CCG TGC GCT TTC GGC CCC ATC GTG  
 Asp Lys Phe Phe Phe Glu Gly Ser Pro Cys Ala Phe Gly Pro Ile Val  
 550 555 560

# DE 198 41 413 C 1

	CGC	CTG	CTG	CGC	GCC	CGC	AAA	GTG	AGG	GTG	CTG	CGC	GGC	CCT	TGC	GCC	336
	Ala	Leu	Leu	Arg	Ala	Arg	Lys	Val	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Pro	Cys	Ala	
	565						570					575					
5	CTG	GCC	TTC	CGC	GAA	AAA	GTG	GCC	TAC	TGG	GGC	ATC	GAC	GAA	ACG	CGG	384
	Leu	Ala	Phe	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	Tyr	Trp	Gly	Ile	Asp	Glu	Thr	Arg	
	580					585					590					595	
10	CTG	GAA	CGC	TGC	TGC	CTG	CGC	CGC	CTG	CGC	CGC	CGC	GAG	GAG	GAG	GCC	432
	Leu	Glu	Arg	Cys	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Arg	Arg	Arg	Glu	Glu	Glu	Ala	
					600					605						610	
15	CCC	GAG	GCC	AGC	GCC	GCG	CAG	CCC	GCC	CGA	GGG	CCG	CAG	ACC	ACC	CCC	480
	Pro	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Arg	Gly	Pro	Gln	Thr	Thr	Pro	
				615					620					625			
20	CGC	CGA	GCC	CTG	GGA	CCC	AGC	GGG	CGG	CTG	GAG	AGA	GGC	AGA	CGG	CGC	528
	Arg	Arg	Ala	Leu	Gly	Pro	Ser	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Gly	Arg	Arg	Arg	
				630				635					640				
25	TTG	CGA	GAC	GTG	GTG	GAG	AAC	CCG	CAC	TCC	GGG	CTG	GCG	GGC	ATC	TTT	576
	Leu	Arg	Asp	Val	Val	Glu	Asn	Pro	His	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Ile	Phe	
		645					650					655					
30	TTC	GCA	TAT	GTC	TCC	GTG	GCT	TTC	GTG	GCC	GTC	ACA	GCC	GTC	GGC	TTG	624
	Phe	Ala	Tyr	Val	Ser	Val	Ala	Phe	Val	Ala	Val	Thr	Ala	Val	Gly	Leu	
	660					665					670					675	
35	TGC	CTG	AGC	ACC	ATG	CCG	GAT	GTC	CGC	GCA	GAA	GAG	GAA	CGG	GGC	GAG	672
	Cys	Leu	Ser	Thr	Met	Pro	Asp	Val	Arg	Ala	Glu	Glu	Glu	Arg	Gly	Glu	
					680					685					690		
40	TGC	TCC	ACA	AAG	TGC	CGC	AAC	CTG	TTC	GTG	CTG	GAG	ACG	GTG	TGC	GTG	720
	Cys	Ser	Thr	Lys	Cys	Arg	Asn	Leu	Phe	Val	Leu	Glu	Thr	Val	Cys	Val	
				695				700						705			
45	GCC	TGG	TTC	TCC	TTC	GAG	TTC	CTG	CTG	CGC	TCC	CTG	CAG	GCT	GAG	AGC	768
	Ala	Trp	Phe	Ser	Phe	Glu	Phe	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Ser	
				710				715					720				
50	AAG	TGC	GCC	TTC	CTC	CGG	ACG	CCG	CTT	GCC	ATC	ATC	GAC	ATC	CTG	GCC	816
	Lys	Cys	Ala	Phe	Leu	Arg	Thr	Pro	Leu	Ala	Ile	Ile	Asp	Ile	Leu	Ala	
		725					730					735					
55	ATC	CTG	CCC	TTA	TAC	GTG	TCG	CTG	CTC	GCG	GGA	CTG	GCG	GCA	GGG	CCC	864
	Ile	Leu	Pro	Leu	Tyr	Val	Ser	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Pro	
	740					745					750					755	
60	ACG	GGC	AGC	AAG	ATG	CTG	GAG	CGC	GCG	GGT	CTG	GTG	CTG	CGG	CTG	CTG	912
	Thr	Gly	Ser	Lys	Met	Leu	Glu	Arg	Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Leu	
					760					765					770		
65	CGG	GCG	CTG	CGC	GTG	CTC	TAC	GTG	ATG	CGC	CTG	GCG	CGC	CAC	TCG	TTG	960
	Arg	Ala	Leu	Arg	Val	Leu	Tyr	Val	Met	Arg	Leu	Ala	Arg	His	Ser	Leu	
				775					780					785			
70	GGG	CTG	CGC	TCG	CTT	GGC	CTC	ACC	GTG	CGC	CGC	TGC	GCG	CGC	GAG	TTC	1008
	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Gly	Leu	Thr	Val	Arg	Arg	Cys	Ala	Arg	Glu	Phe	
			790					795					800				
75	GGA	CTG	CTG	CTG	CTC	TTC	CTC	TGC	GTG	GCC	ATG	GCG	CTC	TTC	GCG	CCG	1056
	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Cys	Val	Ala	Met	Ala	Leu	Phe	Ala	Pro	
		805					810					815					
80	CTC	GTG	CAC	CTG	GCT	GAG	CGC	GAG	CTG	GCC	GCT	CAC	CGC	GAC	TTC	TCC	1104
	Leu	Val	His	Leu	Ala	Glu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ala	His	Arg	Asp	Phe	Ser	
	820					825					830					835	

# DE 198 41 413 C 1

AGC GTC CCC GCC AGC TAC TGG TGG GCA GTC ATC TCC ATG ACC ACC GTG Ser Val Pro Ala Ser Tyr Trp Trp Ala Val Ile Ser Met Thr Thr Val	1152	
840 845 850		
GGC TAT GGA GAC ATG GTG CCG CGC AGC CTT CCG GGC CAG GTG GTG GCG Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Arg Ser Leu Pro Gly Gln Val Val Ala	1200	5
855 860 865		
CTG AGC AGC ATC CTC AGC GGC ATC CTG CTC ATG GCC TTC CCT GTC ACC Leu Ser Ser Ile Leu Ser Gly Ile Leu Leu Met Ala Phe Pro Val Thr	1248	10
870 875 880		
TCC ATC TTC CAC ACC TTC TCG CGC TCC TAT TCG GAG CTC AAG GAG CAG Ser Ile Phe His Thr Phe Ser Arg Ser Tyr Ser Glu Leu Lys Glu Gln	1296	15
885 890 895		
CAA CAG CGC GCG GCC AGC CCT GAA CCG GCC CTG CGC GAG GAC AGC ACC Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu Arg Glu Asp Ser Thr	1344	20
900 905 910 915		
CGT GAT GAC AGT ACA CGT TCG GCC AGC GCC ACT GAG GAC AGC TCT CAG Arg Asp Asp Ser Thr Arg Ser Ala Ser Ala Thr Glu Asp Ser Ser Gln	1392	
920 925 930		
GAC CCT GAG ACC GCA GGC GCG GCA GGG AAC TTG CCG GGC CGG GTG GGA Asp Pro Glu Thr Ala Gly Ala Ala Gly Asn Leu Pro Gly Arg Val Gly	1440	25
935 940 945		
CCC TGA Pro *	1446	30

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 482 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

### (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Arg Leu Leu Gly His Pro Glu Ala Pro Asp Ala Glu Pro Gly 1 5 10 15	45
Ser Ala Gly Arg Gln Gly Arg Gly Gly Arg Gly Ala Arg Ala Arg His 20 25 30	
Val Val Ile Asn Ile Trp Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp Ala Ala 35 40 45	50
Leu Ala Arg Cys Leu Leu Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Thr Cys Arg 50 55 60	
Gly His Glu Lys Leu Leu Arg Val Cys Tyr Asp Tyr Asp Met Ser Arg 65 70 75 80	55

**● ●**      **● ●**

65

# DE 198 41 413 C 1

Ser Ile Phe His Thr Phe Ser Arg Ser Tyr Ser Glu Leu Lys Glu Gln  
 420 425 430  
 Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu Arg Glu Asp Ser Thr  
 435 440 445  
 Arg Asp Asp Ser Thr Arg Ser Ala Ser Ala Thr Glu Asp Ser Ser Gln  
 450 455 460  
 Asp Pro Glu Thr Ala Gly Ala Ala Gly Asn Leu Pro Gly Arg Val Gly  
 465 470 475 480  
 Pro \*

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 620 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

### (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

### (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo Sapiens

### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 150..620
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "kodierender Bereich des humanen genomischen SacI/PstI-Fragmentes"

### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GAGCTACCT CCGAGGGTTC GGTGCCGGCC CGGCCCTGG ATCCCCGCGG GCGGACGCGC 60  
 TCCCCAGCT CAGCCCTCGC GACCCTAACG CGGTCCGTTC CTTTTCAGG AGCCGGGCAG 120 40  
 GAGCCCCTCG GTCCGGTCCG GCCCTGCGC ATG GAG CCA TGG CCC TGC TCC CCG 173  
 Met Glu Pro Trp Pro Cys Ser Pro 5  
 GGC GGC GGC GGC GGC ACC CGC GCC CGG CAC GTC ATC ATC AAC GTG GGC 221 45  
 Gly Gly Gly Gly Gly Thr Arg Ala Arg His Val Ile Ile Asn Val Gly 10 15 20  
 GGC TGC CGC GTG CGC CTG GCA TGG GCC GCG CTG GCG CGA TGC CCC CTC 269 50  
 Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp Ala Ala Leu Ala Arg Cys Pro Leu 25 30 35 40  
 GCG CGC CTG GAG CGC CTG CGC GCC TGC CGC GGC CAC GAC GAC CTG CTG 317  
 Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Ala Cys Arg Gly His Asp Asp Leu Leu 45 50 55  
 CGC GTG TGT GAC GAC TAC GAC GTG AGC CGC GAC GAG TTC TTC TTC GAC 365  
 Arg Val Cys Asp Asp Tyr Asp Val Ser Arg Asp Glu Phe Phe Asp 60 65 70

# DE 198 41 413 C 1

CGC AGC CCG TGC GCC TTC CGC GCC ATC GTG GCG CTT TTG CGC GCA GGG 413  
 Arg Ser Pro Cys Ala Phe Arg Ala Ile Val Ala Leu Leu Arg Ala Gly  
 75 80 85

5 AAG CTG CGA CTG CTG CGG GGC CCG TGC GCG CTG GCC TTC CGA GAC GAG 461  
 Lys Leu Arg Leu Leu Arg Gly Pro Cys Ala Leu Ala Phe Arg Asp Glu  
 90 95 100

10 CTG GCC TAC TGG GGC ATC GAC GAG GCG GCG ATG GAC TGC CGC TGC CTG 509  
 Leu Ala Tyr Trp Gly Ile Asp Glu Ala Arg Met Asp Cys Arg Cys Leu  
 105 110 115 120

CGC CGC ATG CGC CGC CGC GAG GAG GAG GCG GCC GAG GCC CGC GCG GGG 557  
 Arg Arg Met Arg Arg Arg Glu Glu Glu Ala Ala Glu Ala Arg Ala Gly  
 125 130 135

15 CCG ACG GAG CGC GGG GCG CAG GGG AGC CCG GCG CGC GCC CTG GGA CCT 605  
 Pro Thr Glu Arg Gly Ala Gln Gly Ser Pro Ala Arg Ala Leu Gly Pro  
 140 145 150

20 CGG GGG CGG CTG CAG 620  
 Arg Gly Arg Leu Gln  
 155

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 157 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Glu Pro Trp Pro Cys Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Thr Arg Ala  
 1 5 10 15

Arg His Val Ile Ile Asn Val Gly Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp  
 20 25 30

Ala Ala Leu Ala Arg Cys Pro Leu Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Ala  
 35 40 45

Cys Arg Gly His Asp Asp Leu Leu Arg Val Cys Asp Asp Tyr Asp Val  
 50 55 60

Ser Arg Asp Glu Phe Phe Phe Asp Arg Ser Pro Cys Ala Phe Arg Ala  
 65 70 75 80

Ile Val Ala Leu Leu Arg Ala Gly Lys Leu Arg Leu Leu Arg Gly Pro  
 85 90 95

Cys Ala Leu Ala Phe Arg Asp Glu Leu Ala Tyr Trp Gly Ile Asp Glu  
 100 105 110

Ala Arg Met Asp Cys Arg Cys Leu Arg Arg Met Arg Arg Arg Glu Glu  
 115 120 125

Glu Ala Ala Glu Ala Arg Ala Gly Pro Thr Glu Arg Gly Ala Gln Gly  
 130 135 140

Ser Pro Ala Arg Ala Leu Gly Pro Arg Gly Arg Leu Gln  
 145 150 155

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 392 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

5

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

10

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Maus

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
 (B) LÄNGE: 1..162  
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Maus Kv6.2 (3'-Bereich)"

15

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

20

GAG CTC AAG GAG CAG CAA CAG CGC GCG GCC AGC CCT GAA CCG GCC CTG 48  
 Glu Leu Lys Glu Gln Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu  
 1 5 10 15

CGC GAG GAC AGC ACG CGT GAT GAC AGT ACA CGT TCG GCC AGC GCC ACT 96 25  
 Arg Glu Asp Ser Thr Arg Asp Asp Ser Thr Arg Ser Ala Ser Ala Thr  
 20 25 30

GAG GAC AGC TCT CAG GAC CCT GAG ACC GCA GGC GCG GCA GGG AAC TTG 144  
 Glu Asp Ser Ser Gln Asp Pro Glu Thr Ala Gly Ala Ala Gly Asn Leu 30  
 35 40 45

CCG GGC CGG GTG GGA CCC TGAGCTGTAC TGAGAACTTC AAGAGAGTCA 192  
 Pro Gly Arg Val Gly Pro 50 35

AGAGCCTCGG AGGACACCTA GCGCCAACTG ACCCAGGAGT TGGCAAACCTT GGTCTGGCAT 252

ATCCTTGCAG CTGGCTCGCC TCCCCAAGCA ATTCCCAGC TTCGCATAGC CTGGAGGATA 312

TAGCAACCTG GCTTTCTTTT TGCTTTTATT TTCCCTTCAG TTTTAAATTT TCTATGGCTA 372 40

ATTAAAAATA ATTGAGTCCC 392

45

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 54 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

50

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

55

60

65

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



DE 198 41 413 C 1

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA

10

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo Sapiens

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_RNA
- (B) LAGE: 1..36

15

- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Intron/Exon-Übergang"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 24..36

20

- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "kodierender Bereich/Exon"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

25

CCCCGTGTCC CCTCTCCCC GCAG GGC GAG TGC TCC  
Gly Glu Cys Ser  
1

36

30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Gly Glu Cys Ser  
1

45

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA

60

65

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Maus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..27

(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "kodierender Bereich: Übergang Exon 1  
zu Exon 2"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GCA GAA GAG GAA CGG GGC GAG TGC TCC  
Ala Glu Glu Glu Arg Gly Glu Cys Ser  
1 5

27

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Ala Glu Glu Glu Arg Gly Glu Cys Ser  
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo Sapiens

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..27

(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "kodierender Bereich: Übergang Exon 1  
zu Exon 2"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GCC GAG GAG GAG CGG GGC GAG TGC TCC  
Ala Glu Glu Glu Arg Gly Glu Cys Ser  
1 5

27

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Ala Glu Glu Glu Arg Gly Glu Cys Ser  
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..32
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 1  
/note= "Primer für PCR"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 17..32
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 1  
/note= "Kodierender Bereich im Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

AGTTACTCTT CACCAC CAT GGA GCC ATG GCC C  
Met Glu Pro Trp Pro  
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Met Glu Pro Trp Pro  
1 5

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 19:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..32
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 6  
/note= "Primer für PCR"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

AGTTACTCTT CACCCCGCTC CTCCTCGGCG CG

32

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 20:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..30
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 5  
/note= "Primer für PCR"

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 13..30
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 5  
/note= "Kodierender Bereich im Primer"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

AGTTACTCT TCA GGG CGA GTG CTC CCC CAA  
Gly Glu Cys Ser Pro Lys  
1 5

30

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 21:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Gly Glu Cys Ser Pro Lys  
1 5

5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 22:

10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..27
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 4  
/note= "Primer für PCR"

20

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

AGTTACTCTT CATGTGGGCG GCGCAGG

27

30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 23:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..17
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= M13  
/note= "Primer zum Sequenzieren"

45

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

55

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

60

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

65

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..19
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Reverse  
/note= "Primer zum Sequenzieren"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

GGAAACAGCT ATGACCATG 19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..20
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= T3  
/note= "Primer zum Sequenzieren"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

AATTAACCCT CACTAAAGGG

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..19
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= T7  
/note= "Primer zum Sequenzieren"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

GGAAACAGCT ATGACCATG

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 27:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

10

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..5
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Kozak  
/note= "Zum Einbau in Seaml"

15

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

CCACC

5

20

## Patentansprüche

1. Kaliumkanalprotein, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist. 25
2. Kaliumkanalprotein, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die in SEQ ID NO: 4 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist.
3. Kaliumkanalprotein, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Homologes, ein Derivat oder ein Fragment des Kaliumkanalproteins nach Anspruch 1 oder 2 ist, das die gleiche elektrobiologische, pharmakologische und/oder biologische Wirkung und/oder Immunogenität aufweist. 30
4. Kaliumkanalprotein nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Aminosäureidentität von mindestens 60% zum humanen Kaliumkanalprotein (SEQ ID NO: 2) aufweist und einer vom Menschen verschiedenen Spezies entstammt.
5. Kaliumkanal, **dadurch gekennzeichnet**, daß er mindestens das Kaliumkanalprotein einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält. 35
6. Kaliumkanal nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß er zusätzlich das Kaliumkanalprotein Kv2.1 enthält.
7. Kaliumkanal nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein spannungsabhängiger Kaliumkanal ist. 40
8. Nukleinsäuremolekül, **dadurch gekennzeichnet**, daß es für ein Kaliumkanalprotein nach den Ansprüchen 1 bis 4 kodiert.
9. Nukleinsäuremolekül, **dadurch gekennzeichnet**, daß es für einen Kaliumkanal nach den Ansprüchen 5 bis 7 kodiert.
10. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Sequenz enthält, die aus der Gruppe bestehend aus 45
  - a) der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz,
  - b) der in SEQ ID NO: 3 angegebenen Nukleotidsequenz,
  - c) syngenen oder komplementären Sequenzen der Sequenzen gemäß a) oder b), soweit sie für ein Protein mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität kodieren, und
  - d) allelischen Varianten und Fragmenten der Sequenzen gemäß a), b) oder c), soweit sie für ein Protein mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität kodieren.
11. Vektor, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eines oder mehrere der Nukleinsäuremoleküle nach Anspruch 8 enthält. 55
12. Vektor nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein Expressionsvektor ist.
13. Vektor, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eines oder mehrere der Nukleinsäuremoleküle nach Ansprüchen 9 oder 10 enthält.
14. Vektor nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein Expressionsvektor ist.
15. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit einem Vektor nach den Ansprüchen 11 oder 12 transformiert ist. 60
16. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit einem Vektor nach den Ansprüchen 13 oder 14 transformiert ist.
17. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit einem Vektor nach den Ansprüchen 11 oder 12 und einem weiteren Vektor, der eine Nukleinsäuremolekül enthält, das für ein weiteres Kaliumkanalprotein kodiert, transformiert ist. 65
18. Wirtszelle nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß der weitere Vektor ein Nukleinsäuremolekül enthält, das für das Kaliumkanalprotein Kv2.1 kodiert.

19. Wirtszelle nach den Ansprüchen 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine CHO-Zelle ist.
20. Wirtszelle nach den Ansprüchen 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Xenopus Oozyt ist.
21. Wirtszelle nach den Ansprüchen 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie den durch die Vektoren kodierten Kaliumkanal exprimiert.
22. Wirtszelle nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie den durch die Vektoren kodierten Kaliumkanal auf ihrer Oberfläche exprimiert.
23. Verfahren zur Expression eines Kaliumkanals, dadurch gekennzeichnet, daß man eine eukaryontische Wirtszelle nach den Ansprüchen 16 bis 22 unter Bedingungen kultiviert, die zur Expression des Kaliumkanals geeignet sind.
24. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen; zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) an Wirtszellen nach den Ansprüchen 16 bis 22 den Kaliumauswärtsstrom mißt,
  - b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
  - c) an Wirtszellen erneut den Kaliumauswärtsstrom mißt,
- wobei der Unterschied zwischen dem Kaliumauswärtsstrom vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man den Kaliumauswärtsstrom mit Hilfe der "patch-clamp"-Methode bestimmt.
26. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine öffnende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz keine Kaliumauswärtsströme fließen, Kaliumauswärtsströme fließen.
27. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine aktivierende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom verstärkt wird.
28. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine schließende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz Kaliumauswärtsströme fließen, keine Kaliumauswärtsströme fließen.
29. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine inaktivierende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom vermindert wird, ohne daß der Kaliumauswärtsstrom vollständig zum Erliegen kommt.
30. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine verändernde Substanz ist, wenn durch Zugabe der Substanz biophysikalische Eigenschaften des Kaliumkanals wie Spannungsabhängigkeit, Leitfähigkeit, Aktivierungszeitkonstanten, Inaktivierungszeitkonstanten, Schaltverhalten, Offenzeiten oder Geschlossenzeiten verändert werden.
31. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine verändernde Substanz ist, wenn durch Zugabe der Substanz die Zelloberflächenexpression des Kaliumkanals verändert wird.
32. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) an Wirtszellen nach den Ansprüchen 16 bis 22 das Membranpotential mißt,
  - b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
  - c) an Wirtszellen erneut das Membranpotential mißt,
- wobei der Unterschied zwischen dem Membranpotential vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.
33. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man
- a) an den erfindungsgemäßen Wirtszellen nach den Ansprüchen 16 bis 22, das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom mißt,
  - b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
  - c) das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom erneut mißt,
- wobei die Unterschiede zwischen dem Membranpotential und dem Kaliumauswärtsstrom vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.
34. Antikörper, der an das isolierte Kaliumkanalprotein nach den Ansprüchen 1 bis 4 bindet.
35. Antikörper, der an das Kaliumkanalprotein nach den Ansprüchen 1 bis 4 bindet, wobei das Kaliumkanalprotein Bestandteil eines Kaliumkanals nach den Ansprüchen 5 bis 7 ist.
36. Antikörper nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß er ein polyklonaler Antikörper ist.
37. Antikörper nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß er ein monoklonaler Antikörper ist.

---

Hierzu 11 Seite(n) Zeichnungen

---



- Leerseite -

### Probe A





## Figur 1 B (Forts tzung)

hKv6.2	TCCCTGGCCGTCCTACGTCCTGGGCTGGCGGCGAGGCCCGGCGGACCAAGC	035
mkv6.2	-----C--A-----CGC--A-----G--CACG--C-G--A-----	
hKv6.2	TCCCTGGAGCGCGCGGGCTGGTGGCTGGGCTGGCTGGGCTGGCGCTGGCGTGA	095
mkv6.2	-G-----T-----G-----G-----	
hKv6.2	TGGCCCTGGCGCGGCCACCTCGCTGGGGCTGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG	955
mkv6.2	-----T-----C-----T-----C-----G-----	
hKv6.2	CGCGCAGCTTCGGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGC	1015
mkv6.2	-----A-----C-----G-----G-----	
hKv6.2	TGGTGGACCTTGGCCGAGCGGAGCTGGGCGCGCGCGCGCTTCCAGCGTGGCCG	1075
mkv6.2	-C-----T-----T-----A-----C-----	
hKv6.2	GCCTATTTGGTGGGCGCTCACTCCATGACCACTGGGCTACGGCGACATGGTCCCG	1135
mkv6.2	-----C-----A-----T-----T-----AG-----G-----	
hKv6.2	GCCCTGCCCGGCGCAGGTGGTGGGCTTACGACAGCTTCCCTACGGGCTTCCCT	1195
mkv6.2	-----T-----G--C-----G-----G-----	
hKv6.2	TCCCGGTCACCTTCCATCTCTCCACACCTTCTGGGCTCCCTACTCCGAGCTCA	1255
mkv6.2	-----T-----C-----T-----G-----	
hKv6.2	AGCAGCGCGCGGCCAGCCCCGAGCGCGGCCCTGCAGGAGGACAGCACGCTCGG	1315
mkv6.2	-A-----T-----T-----A-----GC-----GTCAT--A--GTA	
hKv6.2	CCACCGAGGACAGCTTCGACGGGCCCCGACAGCGGGGCTTGGCCGACGACTCCG	1375
mkv6.2	-ACCTTC--C-----G-CAC--AGGA-AG-TCTCA--A--CT--AGAC--CAGG--CA--	
hKv6.2	CG CTGTGGTGGCGGCGCAGGGCGCTGA	1401
mkv6.2	G-AACT--CC--GC-----TG--A-C-----	1446

Figur 1 C

MEPWPCSPGGGGTRARHVIINVGGCRVRLAWAALARCPLARLERL 46

RACRGHDDLLRVCDYDYSRDEFFFDSPCAFRAIVALLRAGKRLRLRGPCALAFERDELA 106

YWGIDEARLERCCLRRLRRREEEAARAGFTTERGAQGSPARALGPRGRLQRGRRRLRDV 166  
PKC

VDNPHISGLAGKLEFACVSVSEFVAVTAVGLCLSTMPDIRAEERGECSPKCRSLEFVLETVCV 226  
S1

AWFSFEFLIRSLQAESKCAFLRAPLNIIDILALLPFYVSLILGLAAGPGGTKLLERAGLV 286  
S2

LRLLRALRVLYVMRLARIUSGLRSLGLTMRRCARREFGLLLFLCVAMALFAPLVIIAERE 346  
S4 PKC S5

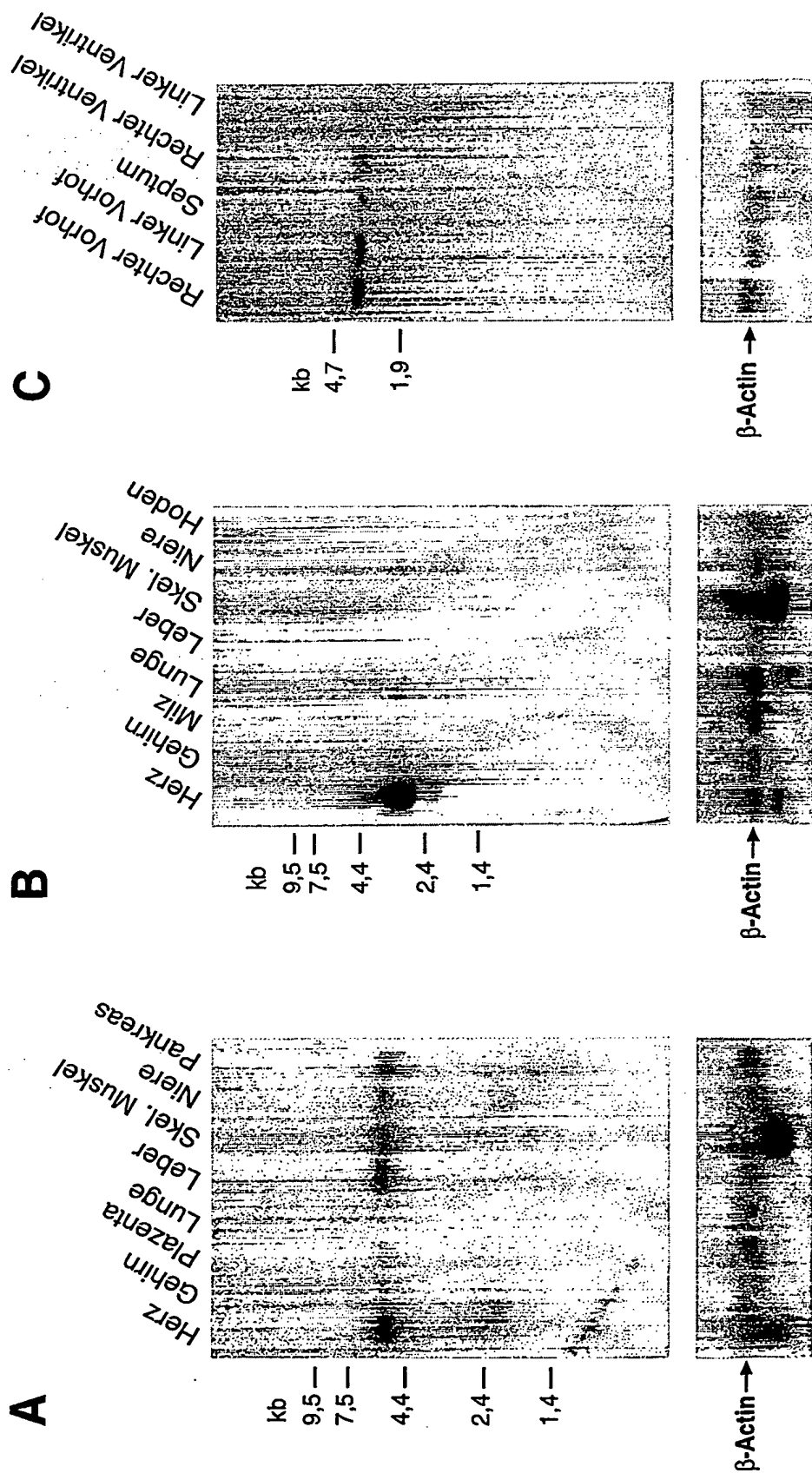
LGARRDFSSVPASYWWAVISM<sup>T</sup>TVGYGDMVPRSLPGQVVALSSILSGILLMAFPVTSIFIH 406  
S6

TFSRSYSELKEQQQRAASPEPALQEDSTHISATATEDSSQGPDSAGLADDSADALWVRAGR 466  
CamK CamK

Figur 1 D

§	rKv6.1	rKv1.4	rKv2.1	rKv3.1	rKv4.2	rKv5.1	rKv8.1
hKv6.2	62.0	35.2	39.2	38.0	34.0	34.0	38.8

Figur 2

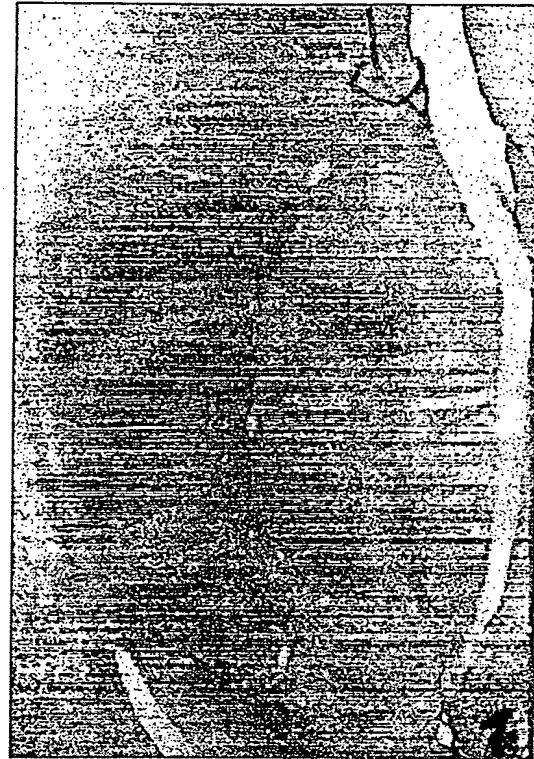


# Expression von Kv6.2 im Hippocampus

Figur 3



Kv6.2 sense



anti Kv6.2 + peptide



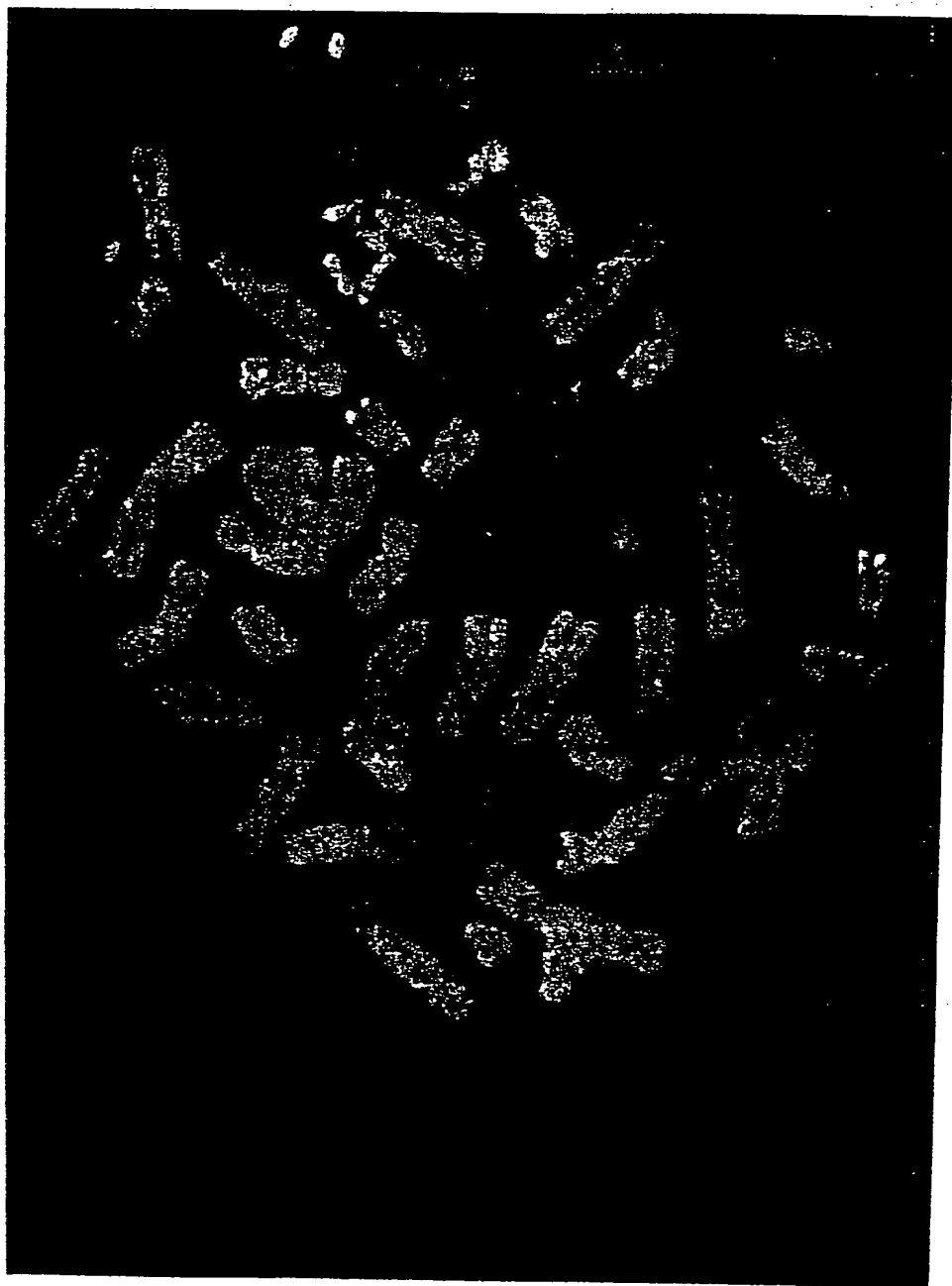
Kv6.2 antisense



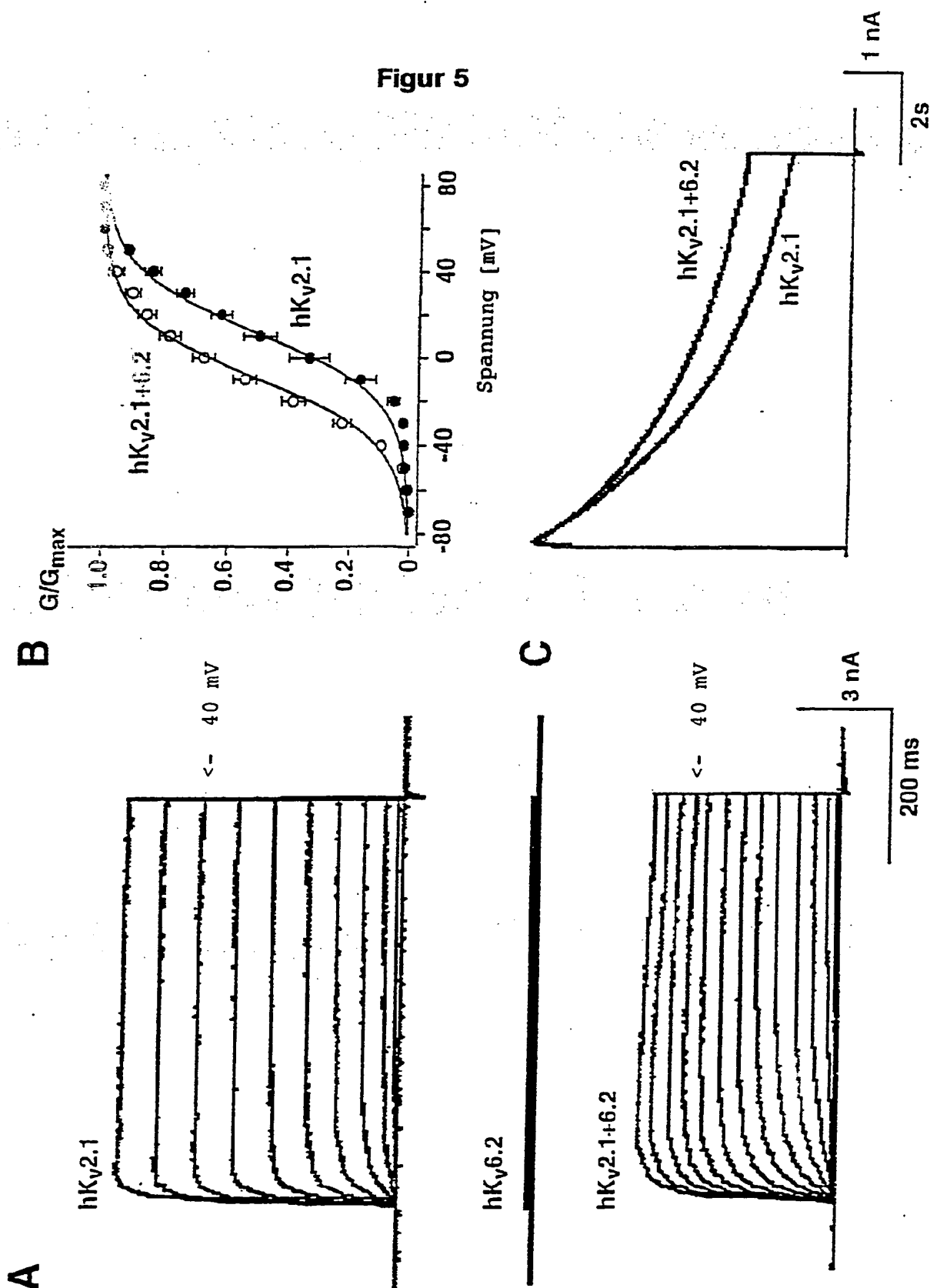
anti Kv6.2



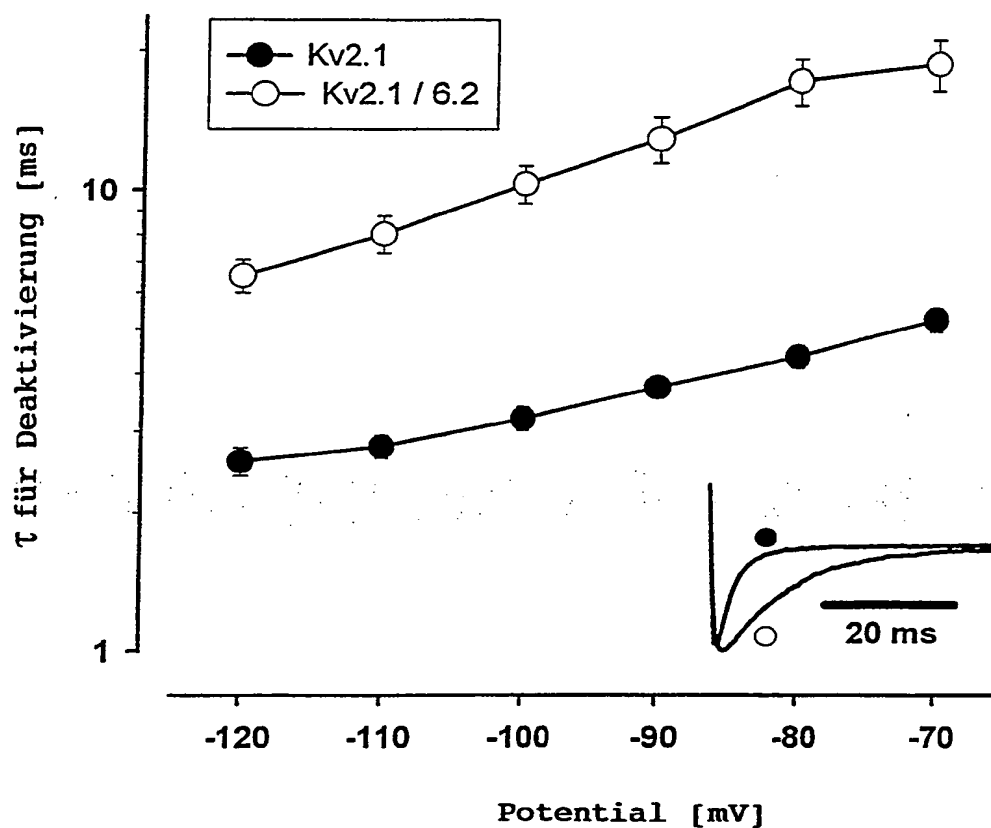
**Figur 4**



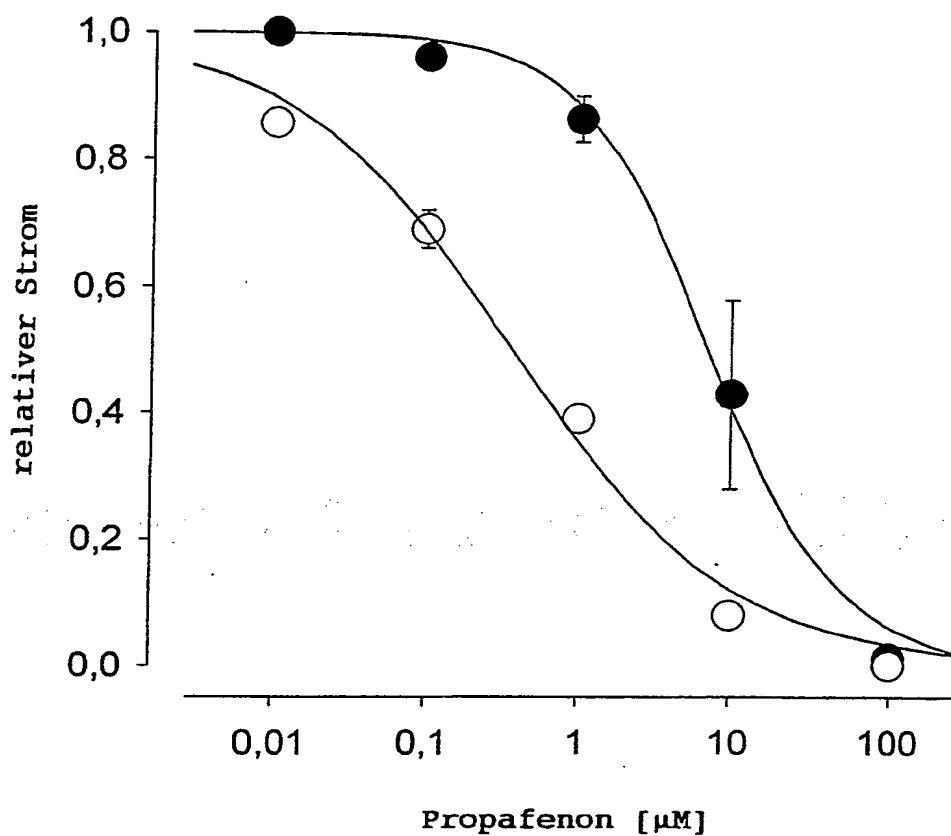
Figur 5



**Figur 6**



**Figur 7**



Kv2.1  $k=7,0\pm0,9$   $H=1,03\pm0,1$

Kv2.1/Kv6.2  $k=0,37\pm0,08$   $H=0,6\pm0,07$